

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA APOPTOSIS EN EL
OÍDO INTERNO DE LA RATA SPRAGUE-DAWLEY EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE OTOTOXICIDAD POR CISPLATINO

DIRECTORES:

DR. RAFAEL RAMÍREZ CAMACHO

DR. JOSÉ RAMÓN GARCÍA BERROCAL

JOSÉ ÁNGEL GONZÁLEZ GARCÍA

MADRID, 2008



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

D. RAFAEL RAMÍREZ CAMACHO, Jefe del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda y Profesor Asociado del Departamento de Cirugía (Otorrinolaringología) de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y

D. JOSÉ RAMÓN GARCÍA BERROCAL, Adjunto al Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda y Profesor Asociado del Departamento de Cirugía (Otorrinolaringología) de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

Hacen constar que:

El presente trabajo titulado “LOCALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA APOPTOSIS EN EL OÍDO INTERNO DE LA RATA SPRAGUE-DAWLEY EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE OTOTOXICIDAD POR CISPLATINO”, ha sido realizado en este Servicio de Otorrinolaringología y bajo nuestra dirección, por el Ldo. José Ángel González García, constituyendo así la Tesis Doctoral de su autor.

Madrid a 20 de Octubre de 2008

Fdo: Rafael Ramírez Camacho

Fdo: José Ramón García Berrocal

En primer y destacado lugar, quiero agradecer a mis Directores de Tesis, los Dres. Rafael Ramírez Camacho y José Ramón García Berrocal, su esfuerzo, su comprensión y su dedicación. Gracias de todo corazón por permitirme llevar a cabo este proyecto, por apoyarme y por estar ahí en algunos momentos cruciales de mi vida personal y profesional. Espero que sigáis “abriendo la mente” de los especialistas que tengan la suerte de compartir vuestra ciencia.

Un cariñoso agradecimiento a todos los becarios, residentes y adjuntos del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda por estos tres magníficos años que hemos compartido.

Especial agradecimiento a las dos personas sin las cuales esta tesis no hubiera sido lo que es, Julián Nevado, y Carolina Sánchez.

Por su especial buen humor y por esa sensación de hacerme sentir como en casa quiero dar las gracias a Pilar Mateu, Joaquina Arias, Vicente Mandado, Pilar Martín y María José Rodríguez.

A Mercedes Zurita y a su equipo gracias por animarme en esos pequeños momentos de flaqueza y por vuestro apoyo con tantos detalles técnicos.

Agradecer a todo el personal del Quirófano Experimental del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda su absoluta disponibilidad y su alegría.

A Isabel Millán, del Departamento de Bioestadística del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, gracias por ayudarme con el análisis estadístico.

Gracias a los que me acogieron y ahora son mi familia, María José, José María, María y Natalia

Esta tesis doctoral es otro fruto del esfuerzo y el amor que mis padres y mi hermana han puesto en mi.

Quiero agradecer, que la persona que más quiero, ha tenido la paciencia suficiente conmigo cuando la he abandonado para dedicarme a la realización del presente trabajo. Compartiendo el esfuerzo y nuestra felicidad podremos ser todavía más felices.

Dedicado a Daniel y a Ana.

Declarad si conviene que se junte la madera
y que sea labrada por el Creador y el Formador,
y si este hombre de madera
es el que nos ha de sustentar y alimentar cuando amanezca.

Entonces hablaron y dijeron la verdad:
“Buenos saldrán vuestros muñecos hechos de madera”.

Del mito de la creación del *Popol Vuh*
Anónimo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1. Introducción demográfica	9
2. Introducción histórica.	12
3. Los agentes quimioterápicos derivados de la química del platino	15
4. Ototoxicidad por Cisplatino.	17
5. Metalómica del platino y sus derivados farmacológicos	20
6. El Cisplatino como inductor de la apoptosis en el oído interno	28
6.1. La apoptosis	28
6.2. Vías de activación de la apoptosis	30
6.3. Mecanismos de activación e inhibición de las caspasas	33
7. Farmacología de los inhibidores de caspasas	35
8. Búsqueda de marcadores precoces de ototoxicidad por Cisplatino	37
9. Técnicas en la investigación en ototoxicidad	39
OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO	41
MATERIAL Y MÉTODOS	45
1. Introducción	47
2. Consideraciones éticas	48
3. Animales de experimentación.	49
4. Cálculo del umbral de audición mediante potenciales evocados auditivos de tronco cerebral	50

5. Preparación de las muestras.	51
6. Preparación para inyección intraperitoneal de inhibidores de la actividad apoptótica	54
7. Caracterización de la apoptosis inducida por Cisplatino en la cóclea de rata Sprague-Dawley	56
7.1. Western blot y contenido proteico	56
7.2. Análisis inmunohistoquímico para la detección morfológica de apoptosis asociada a la caspasa-3	57
7.3. Medida de la actividad de las diferentes caspasas para la determinación de la vía apoptótica predominante	58
7.4. Cuantificación de los niveles de Adenosin-trifosfato	59
7.5. Medición de la actividad total de la superóxido dismutasa	59
8. Expresión y cuantificación en tejido coclear de la Proteína de Choque Térmico-70	61
9. Detección en sangre periférica de la Proteína de Choque Térmico-70	62
10 Análisis estadístico	63
 SECCIÓN EXPERIMENTAL	 65
1. Caracterización del problema. Alteraciones morfológicas y celulares asociadas a la ototoxicidad por Cisplatino	68
1.1. Material y métodos	69
1.2. Hipótesis de trabajo	69
1.3. Resultados	69
2. El Cisplatino como inductor de la apoptosis celular en el oído interno. Modelo experimental de ototoxicidad inducida por Cisplatino y caracterización de la apoptosis inducida por Cisplatino en la rata Sprague-Dawley	76
2.1. Material y métodos	77

2.2. Resultados	78
3. Inhibición de la apoptosis celular mediada por Cisplatino en el oído interno. Modelo experimental de inhibición de la apoptosis celular inducida por Cisplatino en el oído interno	87
3.1. Material y métodos	88
3.2. Resultados	89
4. Detección precoz de ototoxicidad por Cisplatino. La Proteína de Choque Térmico-70 como marcador precoz de ototoxicidad por Cisplatino en la cóclea de rata Wistar	94
4.1. Material y métodos	95
4.2. Resultados	96
5. Modulación de la actividad apoptótica inducida por Cisplatino. La Proteína de Choque Térmico-70 como mediador de la apoptosis inducida por Cisplatino en el oído interno de la rata Sprague-Dawley	98
5.1. Material y métodos	99
5.2. Resultados	100
DISCUSIÓN	107
1. Mecanismo de acción del Cisplatino	109
2. Mecanismos de ototoxicidad por Cisplatino	111
2.1. Ototoxicidad por Cisplatino	111
2.2. Efectos del Cisplatino sobre la morfología coclear	112
2.3. Efectos bioquímicos y moleculares del Cisplatino	117
3. Mecanismos de protección frente a la ototoxicidad por Cisplatino	125
3.1. Mecanismos de protección endógenos frente a la toxicidad coclear por Cisplatino	125

3.2. Mecanismos de protección exógenos frente a la ototoxicidad por Cisplatino	127
3.3. Interferencia de los mecanismos exógenos de protección con el efecto antitumoral del Cisplatino	127
4. Caracterización de la apoptosis como efectora de la ototoxicidad por Cisplatino	130
5. Papel de la Proteína del choque térmico-70 en la ototoxicidad por Cisplatino	135
6. Caracterización cuantitativa y morfológica de la inhibición de la apoptosis en la ototoxicidad por Cisplatino	138
CONCLUSIONES	143
BIBLIOGRAFÍA	147
ANEXO	159
Anexo I	161
Anexo II	169
Anexo III	181

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AIF: Factor inductor de apoptosis. En inglés *apoptosis inducing factor*.

ANOVA: Análisis de la varianza. En inglés *analysis of variance*.

AOMK: Aciloximetilcetónido.

Apaf-1: Factor activador de proteasas apoptóticas-1. En inglés *apoptosis protease-activating factor-1*.

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ATL: Audiometría tonal liminar (0'125 a 8 KHz).

ATP: Adenosín trifosfato.

AUAF: Audiometría tonal de ultra-altas frecuencias (8 a 20 KHz).

Bax: Proteína X asociada al Bcl-2. En inglés *Bcl-2 associated X protein*.

BCA: Ácido bicinconínico. En inglés *bicinchoninic acid*.

Bcl-2: Proteína-2 de linfoma de células B. En inglés *B-cell lymphoma 2*.

BOC: Benciloxicarboxilo. (en Bioquímica también abreviado como Z-).

BSA: Seroalbúmina bovina. En inglés *bovine seroalbumin*.

Ca²⁺: Ión calcio

Ca²⁺ ATPasa: Calcio adenosintrifosfatasa.

CCE: Células ciliadas externas.

CCI: Células ciliadas internas.

CDDP: *Cis*-diaminodicloroplatino II o Cisplatino.

-COOH: Terminal carboxílico.

DAPI: 4,6-diamino-2-fenilindol. En inglés *4,6-diamidino 2-phenylindole*.

dBHL: Decibelios de pérdida auditiva. En inglés *decibels hearing loss*.

DDTC: Dietilditiocarbamato.

DE: Desviación estándar de la media.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DSS: Dodecilsulfato de sodio.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético. En inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*.

EM: Espectrometría de masas.

ERK: Kinasa reguladora extracelular. En inglés *extracellular signal-regulated kinase*.

FMK: Fluorometilcetónido.

g: Gramo.

µg: Microgramo.

GPx: Glutation peroxidasa.

GR: Glutation reductasa.

HNS: Hipoacusia neurosensorial.

HMG1: Proteína-Dominio de alta movilidad-1. En inglés *high movility group-1*.

4-HNE: 4-Hidroxinonenal.

HO-1: Hemo-oxigenasa-1.

HPMCs: Células cultivadas de músculo liso de peritoneo. En inglés *human perytoneal muscle cells*.

HSP: Proteína de choque térmico. En inglés *heat shock protein*.

ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente. En inglés *Inductively coupled plasma mass spectrometry*.

IL: Interleuquina.

INE: Instituto Nacional de Estadística de España.

iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducida. En inglés *Induced nitric oxide sinthase*.

JNK: Kinasa NH-terminal C-Jun. En inglés *c-Jun NH-terminal kinase*.

K⁺:IÓN potasio.

KHz: Kilohercios.

Kg: Kilogramo.

KIM-1: Molécula del daño renal-1. En inglés *kidney injury molecule-1*.

L: Litro.

M: Molar

m²: Metro cuadrado.

ml: Mililitro.

mM: Milimolar.

MEB: Microscopía electrónica de barrido.

MESNA: 2-mercaptoetanosofonato.

MSFF: Metilfenilsulfonil fluoruro.

MTBA: Ácido 4-metiltiobenzoico. En inglés *4-methylthiobenzoic acid*.

NaCl: Cloruro sódico.

Na⁺/K⁺ATPasa: Sodio-potasio adenosintrifosfatasa.

NF-κB: Factor nuclear κB. En inglés *nuclear factor-κB*.

ng: Nanogramo

nM: Nanomolar

NT-3: Neurotrofina-3.

NADPH: Nicotinamida-adenina dinucleótido-fosfato. En inglés *nicotinamide adenine dinucleotide-phosphate*.

NO: Óxido nítrico. En inglés *nitric oxide*.

NRF2: Factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2. En inglés *nuclear (erythroid derived) related factor 2*.

mg: Miligramo.

O²⁻: Ión superóxido.

OCP: Proteína del órgano de Corti. En inglés *organ of Corti protein*.

OH·: Radical hidroxilo.

OONO: Peroxinitrito.

PBS: Suero salino tamponado con fosfato. En inglés *phosphate buffered saline*.

PEATC: Potenciales evocados auditivos del tronco cerebral.

RLO: Radicales libres del oxígeno.

RLUs: Unidades relativas de luminiscencia. En inglés *relative light units*.

R-PIA: R-fenilisopropiladenosina. En inglés *R-phenil-isopropyl-adenosine*.

SD: Sprague-Dawley.

SOD: Superóxido dismutasa.

TNF: Factor de necrosis tumoral. En inglés *tumor necrosis factor*.

TNFR1: Receptor del factor de necrosis tumoral 1. En inglés *tumor necrosis factor receptor 1*.

TRADD: Dominio de muerte celular asociado al receptor del factor de necrosis tumoral. En inglés *TNF receptor associated death domain*.

TUNEL: Técnica histoquímica para la detección de ADN dañado y sensible para la detección de células apoptóticas. En inglés *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling*.

UA: Unidades arbitrarias.

XIAP: Proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X. En inglés *X-linked inhibitor of apoptosis protein*.

Z-: Benciloxicarboxilo.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción demográfica.

La hipoacusia neurosensorial (HNS) representa actualmente en las sociedades occidentales o industrializadas un problema general de salud pública. El impacto económico y personal de la hipoacusia influye en las relaciones intelectuales, familiares y laborales del sujeto que la padece, además de las especiales implicaciones neurolingüísticas y culturales que incluye la HNS cuando se inicia en el periodo prelocutivo. La etiología de esta HNS es muy variable, siendo las principales causas por orden de frecuencia la degeneración coclear asociada a la edad o presbiacusia, las complicaciones de la patología inflamatoria del oído medio, el traumatismo acústico crónico o agudo, la exposición a fármacos o agentes químicos con capacidad ototóxica y las alteraciones congénitas con o sin malformación del oído interno. Otras causas menos comunes incluyen la hipoacusia súbita, la enfermedad de Menière, la enfermedad inmunomediada del oído interno, la otosclerosis, los traumatismos cráneo-encefálicos y del hueso temporal, los tumores retrococleares y las hipoacusias de origen en el sistema nervioso central¹⁻².

La hipoacusia es una de las enfermedades con capacidad de producir una discapacidad irreversible más frecuentes. Dada la diversidad de manifestaciones y de minusvalía que causa en distintos individuos es difícil dar unas cifras concretas de afectación en España, pero es conocido que en la población mayor de 65 años afecta a más de un 30%, datos en aumento debido al envejecimiento poblacional. La prevalencia de la hipoacusia como enfermedad por grupos de edad puede verse reflejada en la figura 1, según datos del Instituto Nacional de Estadística en España (INE)³.

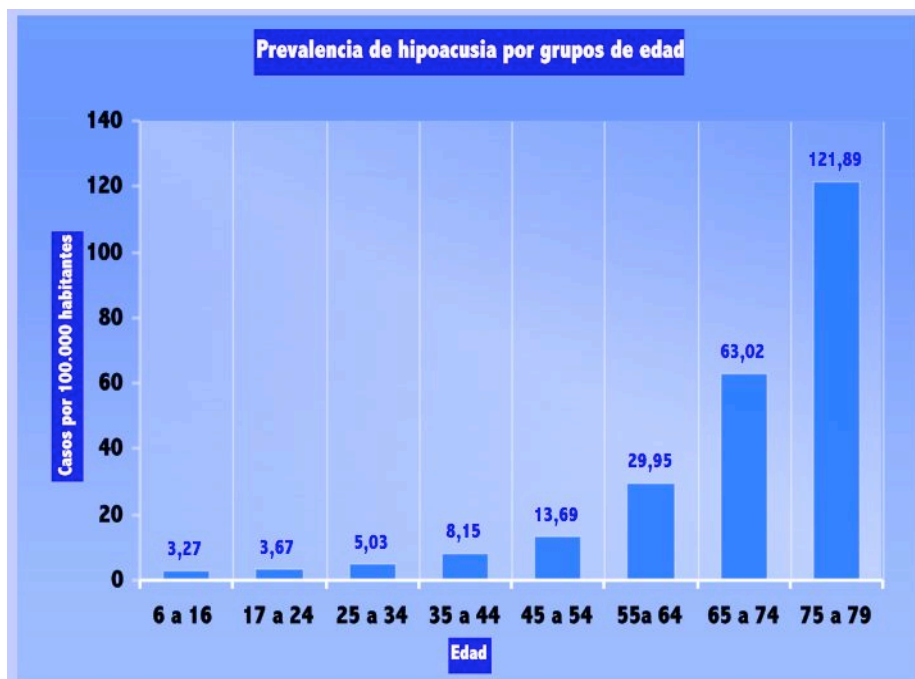


FIGURA 1. PREVALENCIA DE LA HIPOACUSIA POR GRUPOS DE EDAD. FUENTE: INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA.

Según datos del INE, en el año 2000, la hipoacusia representa a un 16'22% de las personas con discapacidad reconocida. La distribución de la discapacidad asociada a deficiencia auditiva por grupos de edades puede verse en la tabla 1³.

	% del total de discapacitados	Número de afectados	Nº/ 100.000 habitantes
Menores de 6 años	12'05%	5.913	2'67
6 a 64 años	4'94%	295.869	9'67
Mayores de 64 años	5'7%	665.479	103'42

TABLA 1. DISCAPACIDAD ASOCIADA A LA HIPOACUSIA POR GRUPOS DE EDAD. FUENTE: INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA³.

La hipoacusia provocada por la exposición a sustancias químicas se conoce como ototoxicidad y está provocada por la alteración de los mecanismos de homeostasis o por lesión estructural del oído interno. En la mayoría de los casos esas sustancias químicas son fármacos administrados para el

tratamiento de distintas dolencias, que producen como efecto secundario un trastorno en la funcionalidad de las células ciliadas del órgano de Corti.

Respecto a la hipoacusia inducida por exposición a fármacos derivados del platino no se conocen las verdaderas cifras de incidencia en la población general pero sí que aproximadamente un 36% de los adultos y entre un 60 y un 100% de los niños que reciben tratamientos con *Cis*-diaminodichloroplatino-(II) o cisplatino (CDDP) van a desarrollar algún tipo de alteración auditiva⁴.

Según datos del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Puerta de Hierro y del Área VI de atención especializada de la Comunidad de Madrid en el período de dos años comprendido entre el 1 de enero de 2006 y el 31 de diciembre de 2007 se administró al menos un ciclo de CDDP a un total de 427 pacientes. Teniendo en cuenta que el Servicio de Farmacia del Área VI de atención especializada da cobertura sanitaria a 341.051 personas (de un área sanitaria de aproximadamente 500.000 habitantes excluyendo a la población pediátrica), podemos deducir que en la Comunidad de Madrid, con una población sanitaria de 5.022.289 habitantes, en los dos próximos años recibirán tratamiento con CDDP unas 6.000 personas, de las cuales entre 2.000 y 2.500 van a sufrir algún deterioro de su sistema auditivo. Extrapolando estas cifra al total del Estado español podríamos inferir que en los próximos dos años entre 16.000 y 25.000 personas sufrirán un deterioro auditivo irreversible relacionado con tratamientos antineoplásicos con fármacos derivados del platino. Es, por lo tanto, indispensable estudiar los mecanismos de aparición y detección de esos fenómenos de toxicidad auditiva para dar en el futuro una esperanza de prevención a un grupo tan numeroso de pacientes.

Al impacto económico del tratamiento oncológico en sí, se debe sumar el coste del tratamiento de las complicaciones que es asumido por los presupuestos públicos, pero en el caso de la paliación de la HNS mediante prótesis auditivas el coste económico total de la rehabilitación protésica recae sobre el propio enfermo o sus familiares, añadiendo al impacto psicofísico de la enfermedad oncológica el impacto económico del tratamiento de las complicaciones de un tratamiento farmacológico con CDDP.

2. Introducción histórica.

Existen varias razones para justificar el olvido que las reacciones adversas a medicamentos en general y los efectos tóxicos sobre la audición en particular experimentan hasta mediados del siglo XX. En primer lugar, los efectos tóxicos de un medicamento eran considerados parte de la curación en sí misma por lo que si la enfermedad mejoraba, los efectos adversos se consideraban una consecuencia inevitable. En segundo lugar la pérdida auditiva no era considerada como una minusvalía digna de tratar. Así, en la cultura espartana los niños sordos o con otros defectos eran considerados inválidos y abandonados; en la judaica a los sordos no se les permitía el derecho a la propiedad o a las relaciones comerciales, y algunas órdenes religiosas católicas como la de los Agustinos consideraban que los sordos no eran dignos de la salvación ya que no podían oír la palabra divina. La primera mención histórica a una hipoacusia de origen tóxica (y la única en siglos) data aproximadamente del año 1000 DC. Abu Ali al-Husayn ibn Abd-Allah ibn Sina más conocido en Occidente como Avicena es el autor del Canon de Medicina (*Avicenna ex Codice antiquo Galeni*) que recoge durante un pasaje concerniente al uso de vapores mercuriales para el tratamiento de la parasitosis por *Pediculus capitis*, la aparición de pérdida auditiva en los pacientes que recibían dicho tratamiento⁵.

Posteriormente Mêlier en 1843⁶ fue el primero en documentar la pérdida auditiva asociada al uso de la quinina, principio activo de la corteza del árbol *Cinchona pubescens*, mientras que Müller en 1877⁷ describió los efectos perniciosos sobre la audición de un paciente que recibió 15 mg/día de salicilato de sodio, principio activo de la corteza de los árboles del género *Sálix* (Sauce).

Más tarde se describieron los efectos tóxicos sobre la audición y el equilibrio de los disolventes inorgánicos como el tolueno y del monóxido de carbono que aparecieron con la llegada de la “Revolución Industrial” aunque no se describieron de manera científica hasta mediados de los años 70. Fue en 1910 cuando Paul Ehrlich describió la primera droga con propiedades antineoplásicas, el Salvarsán, derivado del arsénico y con actividad antisifilítica, describiendo su toxicidad sobre el octavo par craneal y siendo el

primer medicamento moderno con actividad tóxica sobre el oído interno. Ya en el siglo XX se sintetizaron los primeros antibióticos, así Alexander Fleming describió la penicilina en 1929 y Selman Waksman la estreptomicina en 1944, la cual tenía la mayor capacidad de destrucción de las células del oído interno conocida hasta el momento. En los años 60 se descubrieron el Ácido etacrínico y la Furosemida, cuyo efecto ototóxico se potenciaba con la administración simultánea de antibióticos aminoglucósidos. Esta clase de antibióticos alertaron a la comunidad médica y al público en general sobre la capacidad de lesionar el oído interno que poseían cierta clase de drogas, y se disoció la afectación coclear o vestibular que preferentemente poseían los distintos fármacos del grupo de los aminoglucósidos⁵.

El CDDP se descubre en 1845. La reacción del ión $[\text{PtCl}_4]^{2-}$ con NH_3 , en disolución acuosa, da lugar a diferentes complejos en función de las condiciones empleadas, concretamente, en presencia de un exceso de NH_3 , la especie predominante es el llamado cloruro de Peyrone o CDDP⁸. Es un compuesto de gran simplicidad, aunque no es hasta 1969 cuando se comprueban sus efectos inhibitorios de la replicación celular y son publicados los primeros ensayos clínicos⁹. Se describe su efectividad en tumores sólidos, tipificando la frecuente afectación irreversible de la audición y en menor medida del sistema vestibular. También se describe la importante afectación de la audición que puede producir en mucho mayor porcentaje de pacientes cuando se aplica a población pediátrica.

En la tabla 2 se representan los principales acontecimientos históricos en el desarrollo del conocimiento de los efectos tóxicos de algunos fármacos sobre el sistema auditivo.

Hoy en día, el CDDP es considerado como el antineoplásico que más se ha utilizado y el que mayor número de vidas ha salvado. Sin embargo, la toxicidad sigue siendo su principal problema y el factor limitante de su administración. Por ello, numerosos grupos trabajan en la investigación de sus mecanismos de acción y en la reducción de sus efectos tóxicos mediante la administración de los llamados agentes de rescate o protectores. Hasta la fecha ningún compuesto se administra rutinariamente como agente de rescate por falta de ensayos, por disminuir el efecto antineoplásico del CDDP o por toxicidades asociadas.

PRINCIPIOS ACTIVOS	GRUPO TERAPÉUTICO	OTOTOXICIDAD RECONOCIDA
Mercurio	Metales pesados	Principios siglo XI
Quinina, Cloroquina	Antipalúdicos	1843
Aspirina, ibuprofeno, naproxeno, indometacina, fenilbutazona...	Antiinflamatorios no esteroideos	1877
Aceite de Quenopodium	Antihelmínticos	Finales siglo XIX
Salvarsán	Arsenicales	1910
Estreptomicina, amikacina, gentamicina...	Aminoglucósidos	1945
Cloranfenicol, colistina, vancomicina...	Otros agentes antimicrobianos	Años 60
Ácido etacrínico, furosemida...	Diuréticos de Asa	Años 60
Tolueno, bromuro de potasio...	Disolventes industriales	Años 70
Clorhexidina	Desinfectantes tópicos	Años 70
Cisplatino, bleomicina, alcaloides de la <i>Vinca</i> ...	Antineoplásicos	Años 70

TABLA 2 HISTORIA DE LA OTOTOXICIDAD. MODIFICADO DE SCHACHT Y HAWKINS⁵.

N. del A: los artículos históricos de esta sección han sido citados por Schacht y Hawkins⁵.

3. Los agentes quimioterápicos derivados de la química del Platino.

El CDDP, (Figura 2) es un agente quimioterápico basado en la bioquímica del platino y utilizado para el tratamiento de varios tipos de neoplasias sólidas y hematológicas, principalmente sarcomas, carcinomas pulmonares, gastrointestinales, de células germinales y de cabeza y cuello, así como de diversos tipos de linfomas.

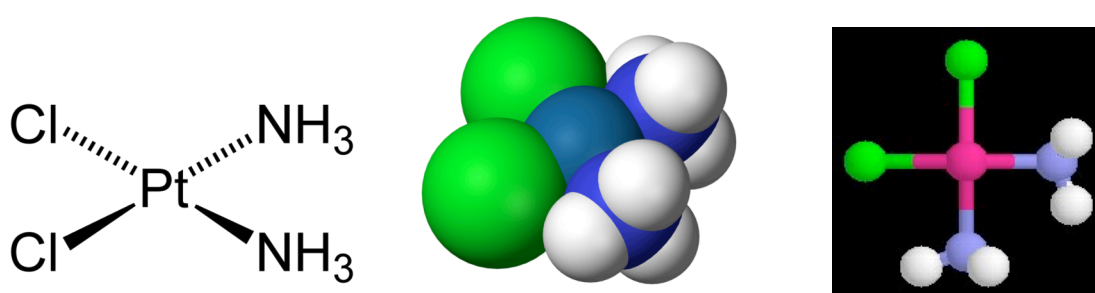


FIGURA 2. REPRESENTACIONES ESQUEMÁTICAS DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DEL CISPLATINO.

Fue el primer miembro de la familia de los antineoplásicos platinados en sintetizarse, descubierto por M. Peyrone en 1845⁸, formulándose mucho después el oxaliplatino por Y. Kidani en 1976¹⁰ (Figura 3) y el carboplatino por un equipo de colaboradores del laboratorio Johnson Matthey entre 1980 y 1982¹¹. (Figura 4).

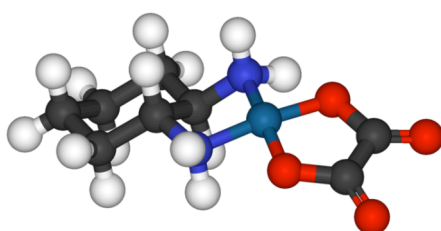


FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA TRIDIMENSIONAL DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DEL CARBOPLATINO.

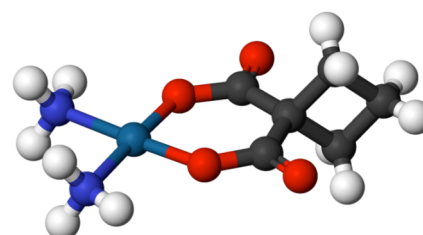


FIGURA 4. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA TRIDIMENSIONAL DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DEL OXALIPLATINO.

Tras el descubrimiento del CDDP, fue sintetizado y se clarificó su estructura molecular por Alfred Werner en 1893, pasando posteriormente al olvido. Todo cambió en 1965 cuando Rosenberg *et al*¹² añadieron el compuesto a un cultivo de *Escherichia coli* provocando la detención de la replicación de la bacteria pero no su crecimiento, apareciendo bacilos que presentaban un tamaño 300 veces superior al normal. Posteriormente se comprobó el efecto antitumoral en ratones y a partir de 1971 se comenzó a utilizar en ensayos clínicos en humanos.

La muerte celular en tejido neoplásico se produce por fijación al Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de forma dosis-dependiente y principalmente por apoptosis, aunque estudios *in vitro* han demostrado la posibilidad de necrosis celular cuando se exponen a altas concentraciones de CDDP¹³. En la actualidad son ya conocidos los efectos tóxicos de los derivados platinados, siendo los más severos los debidos a la toxicidad aguda sobre órganos vitales mientras que la ototoxicidad, la nefrotoxicidad y la neurotoxicidad periférica pueden llevar a una afectación funcional crónica. De acuerdo a los protocolos de quimioterapia establecidos se pretende dar en varias sesiones la mayor dosis posible de fármaco que toleren los pacientes, la cual se ha ido incrementando con el paso del tiempo. También la exposición laboral a derivados platinados ha sido estudiada, estableciéndose una exposición aérea ambiental máxima al metal de 1 mg por metro cúbico de aire al día y a las sales de platino de 0'002 mg por metro cúbico de aire al día¹⁴.

4. Ototoxicidad por CDDP.

La ototoxicidad se define como la alteración bioquímica o estructural del oído interno o del nervio cócleo-vestibular debida a la acción directa de fármacos o sustancias tóxicas dando como resultado una lesión transitoria o permanente de carácter reversible o más frecuentemente definitiva de la audición o el equilibrio.

El efecto antitumoral del CDDP es debido en primer lugar a la capacidad de formar complejos no útiles o aductos de ADN que inhiben la replicación y la transcripción a Ácido Ribonucleico (ARN) en células con alto nivel replicativo como las neoplásicas y en menor medida en las células sanas de diversos órganos diana de la economía y en segundo lugar a la capacidad de producir moléculas de estrés oxidativo y radicales libres del oxígeno (RLO) con una disminución de la actividad de enzimas antioxidantes.

El CDDP es capaz de producir lesiones orgánicas como efecto secundario mediante diversos mecanismos, principalmente por detención del ciclo celular en tejidos que precisan un alto intercambio, como son las mucosas oral y gastrointestinal. En otros órganos como el riñón y el oído interno la toxicidad no es debida a la alteración del ciclo celular sino a la acumulación de sustancias de desecho como los RLO, a la necrosis directa a altas dosis de fármaco y a la promoción de fenómenos apoptóticos cuando se administran dosis relativamente bajas. La apoptosis es la muerte celular producida desde el interior de la propia célula en respuesta a un estímulo que puede tener un origen muy variado. En el caso del CDDP y el oído interno la acumulación de RLO, la alteración del ADN nuclear, la alteración energética mitocondrial y la detención de los fenómenos reparativos llevan a la célula a estimular diversos mecanismos que culminan con la formación de complejos proteicos (caspasas) que producen la muerte celular autoinducida por fragmentación del ADN¹⁵⁻¹⁶.

Una segunda generación de agentes platinados derivados del CDDP ha conseguido un similar efecto antineoplásico pero con una menor ototoxicidad y nefrotoxicidad aunque presentan otros efectos

secundarios como mielosupresión (efecto dosis-limitante del carboplatino) y neuropatía periférica (efecto dosis-limitante del oxaliplatino).

Hasta un 36 % de los pacientes que han recibido dosis estándar de CDDP presentan acúfenos o pérdida auditiva en altas frecuencias llegando a afectar en un considerable número las frecuencias conversacionales¹⁷. Aunque las crecientes dosis de CDDP son un factor importante a la hora de obtener unos efectos citostáticos óptimos¹⁸, los altos niveles alcanzados en tejido sano pueden causar serios efectos secundarios como neuropatía periférica, insuficiencia renal, vestibulopatía periférica e HNS¹⁹⁻²¹.

La pérdida de audición es, en general, permanente, proporcional a la dosis acumulativa recibida y se suele iniciar como una pérdida de tipo perceptivo en frecuencias agudas progresando en aquellos pacientes que reciben dosis repetidas hacia una pérdida en frecuencias medias necesarias para la inteligibilidad del lenguaje. Estudios de pacientes sometidos a audiometría tonal de ultra-altas frecuencias (AUAF) que comprenden desde 8 Kilohercios (KHz) a 20 KHz, permiten monitorizar la audición de los pacientes en tratamiento con CDDP y detectar lesiones de forma precoz incluso previas a la aparición de síntomas otológicos. En nuestros días el daño coclear es la causa más frecuente de interrupción del tratamiento con CDDP debida a efectos indeseados no agudos.

Clásicamente, los principales cambios observados en la cóclea tras la administración de CDDP consisten en la pérdida de las células ciliadas externas (CCE), previa a la de las células ciliadas internas (CCI)²²⁻²⁴, inicialmente en la tercera hilera de las CCE de la porción basal coclear (alteraciones morfológicas, desaparición y fusión de estereocilios) que progresa hacia la porción apical en coincidencia con la progresión de la pérdida auditiva²⁵. El CDDP produce una toxicidad centrada en los estereocilios, el núcleo y las mitocondrias de las CCE pero diferentes estudios han demostrado además daños estructurales morfológicos en las células de soporte²⁵⁻²⁶, las neuronas del ganglio espiral y el componente celular de la estría vascular²⁷⁻²⁹.

En la actualidad parece demostrado que las células de soporte son más sensibles que las CCE al daño producido por agentes platinados, y la alteración de su ultraestructura puede preceder a los cambios detectados en las CCE².

5. Metalómica del platino y sus derivados farmacológicos.

Tras el descubrimiento del CDDP como potencial fármaco antitumoral comenzaron a aparecer los primeros estudios acerca de la distribución del fármaco en organismos vivos. Tothill *et al*³⁰ estudiaron la acumulación total del platino mediante espectrometría de masas (EM) en animales y en humanos tratados con CDDP y carboplatino. En ratas la acumulación resultó ser de entorno al 4% del platino administrado al cabo de 3 meses y en cerdos de un 5% transcurridos 11 meses. La acumulación total en humanos a los 11 meses del tratamiento podía exceder el 5% de la cantidad administrada. Concretamente se ha determinado que el hígado es el órgano que más platino acumula, alcanzándose valores de 0,5 ng/g de platino en tejido húmedo administrando CDDP en dosis de 1 mg/Kg de peso corporal. Otros trabajos coinciden en que el hígado es el órgano que alcanza la concentración de platino más elevada³¹, seguido de la próstata y el riñón. Inferiores son los niveles de platino determinados en vejiga, músculo, testículos, páncreas y bazo, y mucho más reducidos los encontrados en intestino, glándula suprarrenal, corazón, pulmones, cerebro y cerebelo.

La administración de dosis de CDDP de entre 40 y 140 mg/m², inyectado puntualmente o mediante infusiones en periodos de 1 a 24 h de duración, producen la eliminación por la orina del 10 al 40% del fármaco en las primeras 24 horas. A los 5 días de la administración de dosis de 40 a 100 mg/m², del 35 al 51% del platino ha sido excretado por la orina. Alrededor de un 13 a un 17% del platino excretado en la orina al cabo de 1 hora, lo hace en forma de fármaco intacto. La excreción sanguínea de la mayoría del platino intacto administrado se realiza en las primeras horas y sólo un pequeño porcentaje del platino es aclarado más allá de las 24 horas. El hecho de que más del 50% del CDDP administrado persista durante largo tiempo en el organismo se debe a su elevada reactividad con biomoléculas de la sangre o del interior celular. A pesar de haberse encontrado platino en bilis e intestino grueso, la eliminación del CDDP a través de las heces es insignificante³².

Tang *et al*³³ trabajaron en la identificación de especies platinadas en orina de pacientes tratados con CDDP y estudiaron las diferencias entre las especies encontradas en la orina de ratas. Para ello utilizaron diversas técnicas de EM. Haciendo uso de estos datos fue posible la identificación en muestras reales de orina humana de CDDP intacto, su complejo monoacuoso y el complejo *cis*-Pt(NH₃)₂Cl-Creatinina. De la misma manera, se identificaron especies como los aductos CDDP-urea y CDDP-ácido úrico. Tres o cuatro semanas después del tratamiento, aún quedan en la orina 50-100 µg/L de platino mientras que justo después de la infusión del fármaco se detectaron 30-50 mg/L.

Aunque en la célula existen numerosas biomoléculas que podrían actuar como bioligandos del CDDP, la principal diana de las formas hidrolizadas del fármaco es el ADN. La interacción del CDDP con el ADN es la responsable de la muerte celular como así lo confirman las claras correlaciones observadas entre la citotoxicidad y la cantidad de platino unido al ADN³⁴.

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la especiación de un elemento se define como su distribución entre especies químicas definidas dentro de un sistema, implicando su análisis cualquier actividad analítica encaminada a identificar y/o medir cantidades de una o más especies químicas de la muestra. Tomando en consideración esta definición, pero aplicándola a la interacción entre metales y biomoléculas, la metalómica podría definirse como el análisis de las especies que contienen un metal o metaloide dentro de un tejido o célula. Este término fue propuesto por Haraguchi y Matsura³⁵ para dotar a este campo de una entidad científica comparable a la de la proteómica y genómica. El estudio de la interacción de los fármacos antitumorales de platino con biomoléculas presentes en el organismo, es decir la especiación bioinorgánica del platino, podría englobarse dentro de la mencionada metalómica, siendo la técnica más difundida en el estudio de la metalómica del platino la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Al realizar un estudio controlado en ratas Wistar, Esteban-Fernández *et al*³⁶ aplicando una metodología analítica básica basada en ICP-MS se pudo distinguir entre el fármaco que queda libre y el

que se une a biomoléculas, demostrándose por primera vez la ausencia de fármaco libre en los citosoles celulares (fracción soluble) de los órganos analizados (cerebro, cóclea, hígado y riñón).

En la figura 5 se recogen las concentraciones de platino obtenidas a los 3 días tras la inyección única de 16 mg/m² de CDDP, 80 mg/m² de oxaliplatino y 400 mg/m² de carboplatino en cóclea, cerebro, riñón e hígado. Cabe destacar que la acumulación del oxaliplatino en la cóclea es 2'9 veces superior a la de CDDP y sin embargo su capacidad de producción de ototoxicidad es mucho menor, de lo que podemos inferir que la ototoxicidad por CDDP no es debida a un efecto acumulativo del platino sino a su unión a biomoléculas específicas.

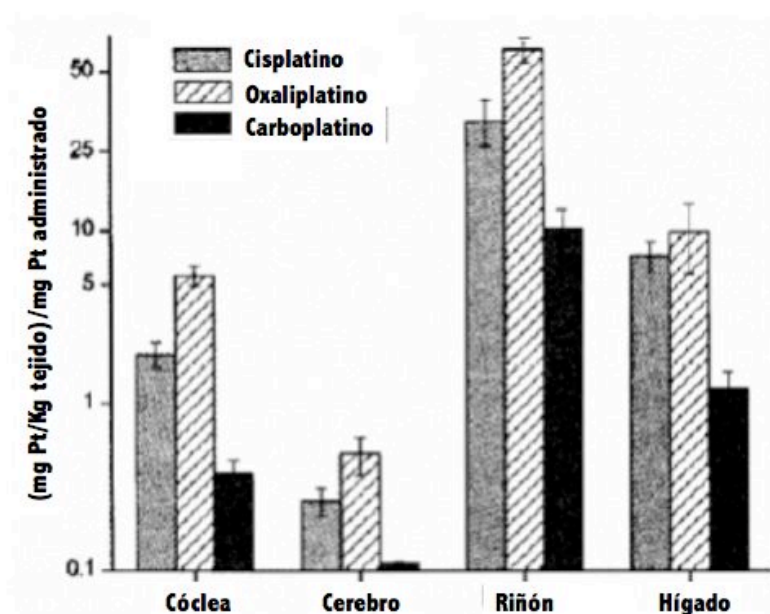


FIGURA 5. ACUMULACIÓN DE PLATINO EN CÓCLEA, CEREBRO, RIÑÓN E HÍGADO AL TERCER DÍA DE ADMINISTRACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS DE LA CANTIDAD TOTAL DE PLATINO EN TEJIDO DESHIDRATADO POR MG DE PLATINO ADMINISTRADO. NÓTESE QUE EL OXALIPLATINO PRESENTA EL MÁXIMO ACÚMULO EN TODOS LOS TEJIDOS. MODIFICADO DE ESTEBAN-FERNÁNDEZ ET AL³⁶.

En la tabla 3 se recogen los porcentajes medios de platino encontrados en cada fracción celular con respecto al total de platino aislado en el tejido. En todas las muestras se aisló más del 85 % del total del platino y los porcentajes no mostrados se refieren a la fracción mitocondrial aislada aparte. Se muestra la acumulación de platino procedente de CDDP, oxaliplatino y carboplatino en núcleo y fracción citosólica de cóclea, hígado y riñón, la cual muestra una acumulación mucho más acentuada en la

fracción nuclear en la cóclea ($\approx 60\%$) respecto al resto de tejidos estudiados ($\approx 15-30\%$) lo cual explicaría la preferencia de la toxicidad por CDDP en el oído interno y el riñón.

	CÓCLEA		RIÑÓN		HÍGADO	
	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma
CISPLATINO	61'9 \pm 0'9	26'0 \pm 1'2	30'8 \pm 0'4	46'9 \pm 0'1	16'8 \pm 0'5	60'8 \pm 1'6
OXALIPLATINO	61'2 \pm 3'0	31'9 \pm 2'9	14'6 \pm 0'9	60'7 \pm 0'5	13'3 \pm 0'2	54'2 \pm 2'0
CARBOPLATINO	61'2 \pm 4'7	30'5 \pm 4'9	19'9 \pm 1'4	61'9 \pm 1'5	22'9 \pm 1'2	63'5 \pm 0'8

TABLA 3. RESULTADOS EN MEDIA DEL PORCENTAJE \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA MEDIA. OBSÉRVESE LA ACUMULACIÓN PREFERENCIAL EN LA FRACCIÓN NUCLEAR COCLEAR FRENTE A LA ACUMULACIÓN PREFERENCIAL EN LA FRACCIÓN CITOSÓLICA EN RIÑÓN E HÍGADO. MODIFICADO DE ESTEBAN-FERNÁNDEZ ET AL³⁶.

Como se puede observar en la figura 6 la unión del platino derivado de CDDP, oxaliplatino y carboplatino a proteínas citosólicas se realiza preferentemente con proteínas de peso molecular mayor de 100 KDa, pero en el caso de cóclea y riñón se demuestra un aumento de esta unión a proteínas menores de 50 KDa, siendo especialmente importante la unión de CDDP a proteínas menores de 3 KDa en la cóclea. Como se ha demostrado que no se encuentra platino libre ni CDDP o sus derivados de forma libre en el citosol³⁷ esta fracción alta de platino citosólico debe estar unida a biomoléculas, probablemente glutatión y proteínas involucradas en los procesos de detoxificación³⁸⁻³⁹.

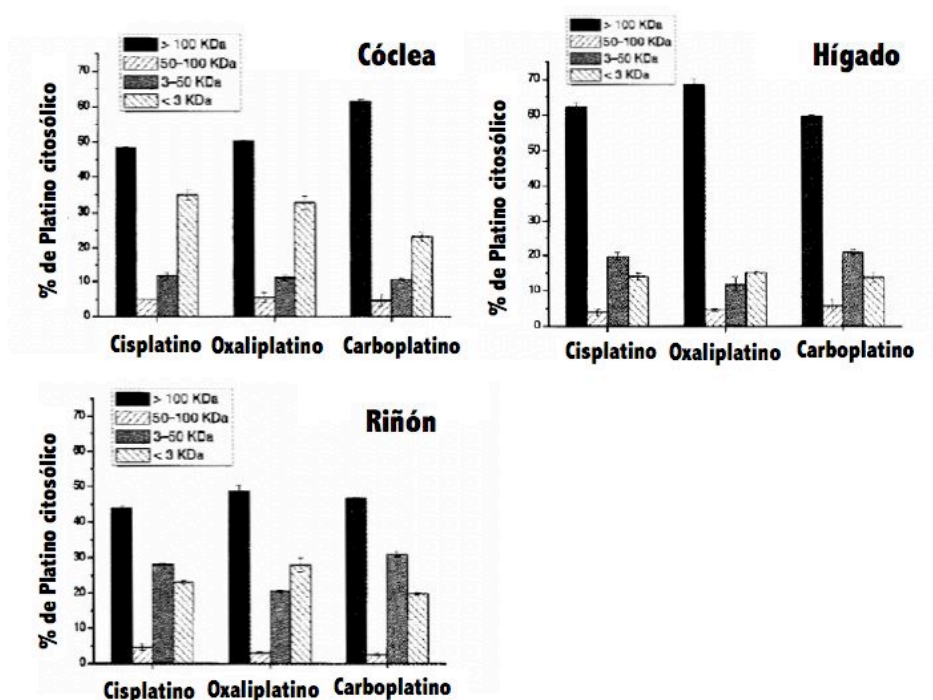


FIGURA 6. UNIÓN DE LAS DISTINTAS DROGAS PLATINADAS A PROTEÍNAS CELULARES DEL CITOPLASMA POR GRUPOS DE PESO MOLECULAR. NÓTESE CÓMO EN LA CÓCLEA Y EL RIÑÓN EXISTE UNA MAYOR CANTIDAD DE PLATINO UNIDO A PROTEÍNAS DE BAJO PESO MOLECULAR Y EN LA CÓCLEA ES ESPECIALMENTE IMPORTANTE LA UNIÓN A PROTEÍNAS DE MENOS DE 3KDa. MODIFICADO DE ESTEBAN FERNÁNDEZ ET AL³⁶.

Al estudiar la acumulación y eliminación del platino tras una dosis de CDDP de 32 mg/m² de los tejidos diana se observa una acumulación que alcanza su máximo entre los 3 y los 7 días y tras una rápida eliminación en los primeros 30 días y más lenta del día 30 al 90 se evidencia una cantidad residual del 20 % en cóclea, del 24 % en riñón, y del 6% en hígado respecto al máximo de concentración. Cuando la administración del CDDP se realiza en forma secuenciada se observa una acumulación máxima de CDDP al tercer día, con un descenso de entre un 26 y un 50% tras el segundo ciclo y un residuo que permanece constante hasta el 5º ciclo (Tabla 4). Este hecho parece indicar la existencia de unos potentes mecanismos de detoxificación y eliminación que pueden llegar a colapsarse ya que tras el 5º ciclo de tratamiento se puede observar un aumento relativo de la concentración de platino³⁶.

	CÓCLEA	RIÑÓN	HÍGADO
Control	No detectado	No detectado	No detectado
Ciclo 1	1'96 ± 0'35	33'3 ± 6'9	7'29 ± 1'38
Ciclo 2	1'25 ± 0'32	21'4 ± 4'0	3'68 ± 0'48
Ciclo 3	1'33 ± 0'34	22'8 ± 5'7	3'84 ± 1'29
Ciclo 4	1'09 ± 0'09	20'8 ± 9'3	3'03 ± 0'65
Ciclo 5	2'20 ± 0'05	28'7 ± 3'1	5'80 ± 0'63

TABLA 4. RESULTADOS EN MG DE PLATINO POR Kg DE TEJIDO DESHIDRATADO EN ANIMALES SOMETIDOS A CICLOS DE CDDP EN UN INTENTO DE REPRODUCIR LAS CONDICIONES DE LA CLÍNICA HUMANA. EL LÍMITE INFERIOR DE DETECCIÓN ES 0'017 MG DE PLATINO POR KG DE TEJIDO. MODIFICADO DE ESTEBAN-FERNÁNDEZ ET AL³⁶.

Una vez corroboradas las especiales implicaciones que las dosis y secuencia de administración de CDDP tienen en la acumulación de platino en el oído interno es de relevante importancia para caracterizar la ototoxicidad inducida por CDDP, la determinación de concentraciones de CDDP en oído interno y su relación a corto, medio y largo plazo con la disfunción del órgano.

GRUPO	CÓCLEA	CEREBRO	CÓCLEA/CEREBRO	Valor p
CONTROL	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	> 0'05
3 DÍAS	1'672 ± 0'54	0'211 ± 0'08	8'133 ± 1'068	0'008
7 DÍAS	3'175 ± 1'94	0'342 ± 0'23	11'382 ± 1'773	0'018
30 DÍAS	0'686 ± 0'08	0'052 ± 0'009	13'613 ± 2'767	0'028
90 DÍAS	0'598 ± 0'598	0'027 ± 0'026	46'526 ± 39'13	0'008

TABLA 5. CONCENTRACIONES RELATIVAS DE PLATINO EN CÓCLEA Y CEREBRO. LOS RESULTADOS ESTÁN EXPRESADOS EN MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR. OBSÉRVESE LA ACUMULACIÓN PREFERENCIAL DE PLATINO EN TEJIDO COCLEAR CON UNA RELACIÓN APROXIMADA DE 8-46:1 EN RELACIÓN A LA ACUMULACIÓN EN CEREBRO. MODIFICADO DE RAMÍREZ-CAMACHO ET AL⁴⁰.

Ramírez-Camacho *et al*⁴⁰ han realizado un estudio interesante para comparar la acumulación de platino en cerebro y oído interno en relación con los hallazgos electrofisiológicos. En la tabla 5 se recogen las concentraciones relativas de platino en cóclea y cerebro en mg de platino por Kg de tejido

deshidratado. Obsérvese cómo la acumulación de platino en cóclea es de 8 a 46 veces mayor en el oído interno que en tejido cerebral poseyendo un origen embriológico y una vascularización común.

Cuando se relacionan estos datos con los Potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC) obtenidos en estado basal y previos al sacrificio se evidenciaron siempre diferencias significativas en los umbrales auditivos antes y después del tratamiento con CDDP. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas en los umbrales cuando se compararon entre sí los grupos con distinta supervivencia ($p=0.790$) a pesar de un incremento paulatino de la cantidad de platino acumulada en el oído interno. Tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al analizar la relación entre la cantidad de platino acumulado en la cóclea frente a los umbrales auditivos obtenidos mediante PEATC ($p>0.05$).

Por lo tanto podemos presumir que la toxicidad coclear asociada a CDDP no es debida a la presencia de platino libre en el núcleo o en el citosol de las células del oído interno ni tampoco es debida a la acumulación del platino en las organelas y el citoplasma sino que es debida a su unión a diversas biomoléculas que parecen ser distintas en el caso del CDDP frente a sus derivados más estudiados, el oxaliplatino y el carboplatino, que tienen una mucha menor toxicidad a nivel del oído interno. Además la principal proporción de platino procedente de todos los compuestos tiene una tendencia a ser fijado por proteínas nucleares en la cóclea cuando no la tiene en riñón u otros órganos. La ototoxicidad por carboplatino y oxaliplatino, siendo más infrecuente, no es un hecho improbable y hasta el momento no se conocen con exactitud los mecanismos específicos de toxicidad auditiva en estos fármacos, y aún no está demostrado si la aparición de otros fenómenos tóxicos que puedan obligar a interrumpir el tratamiento antes de la aparición de la ototoxicidad es la responsable de la menor incidencia, o si realmente estos fármacos tienen una menor capacidad de lesionar el oído interno.

Estudiando este hecho se ha propuesto la teoría de que proteínas como las proteínas del órgano de Corti (OCP) OCP1, OCP2 y la oncomodulina, presentes específicamente en el oído interno y no en otros tejidos podrían ser las responsables de la preferencia tóxica del CDDP por el oído interno.

Estudios de nuestro grupo encaminados a detectar morfológicamente los depósitos de platino en el oído interno mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) asociada a espectrometría de energía dispersiva no han dado resultados satisfactorios hasta la fecha debida a la ínfima cantidad de platino en relación a la presencia de otros metales (especialmente oro) empleados en las técnicas de recubrimiento de las muestras y a la baja sensibilidad de los equipos usados (datos no publicados).

6. El CDDP como inductor de la apoptosis en el oído interno.

6.1. La apoptosis.

La muerte celular programada o apoptosis de líneas celulares en el oído interno es la consecuencia final de varios procesos lesionales como la isquemia, la pérdida de factores tróficos y la exposición a ototóxicos incluyendo el CDDP. Esta forma activa de muerte celular se caracteriza por cambios morfológicos como la contracción celular, la condensación de cromatina y la fragmentación del ADN para la cual se requiere la síntesis de proteínas independientes del calcio (Ca^{2+}) llamadas caspasas.

Tras atravesar la membrana nuclear, el átomo de platino se une al ADN formando puentes cruzados entre la doble cadena. Este hecho provoca que la doble cadena de ADN se rompa en fragmentos de cadena simple que dan lugar a la apoptosis de las CCE, no siendo ésta exclusiva de la ototoxicidad por CDDP, sino que representa el camino final de diversos tipos de noxas^{16,41}.

La unión del CDDP al ADN también conlleva la detención de los fenómenos replicativos y de la transcripción de ADN a ARN lo cual produce la detención del ciclo celular y la muerte celular⁴²⁻⁴³. Esta detención del ciclo celular y los mecanismos apoptóticos se ven favorecidos por la aparición de fenómenos oxidativos y la disminución de mecanismos antioxidantes que llevan a la muerte celular por la activación de las caspasas. Estas proteínas forman los sustratos moleculares de una secuencia específica capaz de activarse por diferentes vías cuyo destino común es la fragmentación del ADN y la detención del ciclo celular con la consiguiente muerte de la célula implicada⁴⁴⁻⁴⁶.

Los mecanismos intracelulares relativos al reconocimiento de estímulos, la transducción de la señal, y la fase ejecutoria de la apoptosis de las CCE tras la exposición a CDDP son aún en parte desconocidos.

La apoptosis (del griego "*caer aparte*", término botánico usado para describir la caída de las hojas en los árboles de hoja caduca) se define como la función celular que controla la capacidad replicativa

y vital de una unidad biológica celular independientemente del resto del tejido adyacente. A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una forma de muerte celular que resulta de un proceso pasivo, accidental y que es consecuencia de la destrucción progresiva de la estructura con alteración definitiva de la función normal en un proceso irreversible que produce la rotura de la membrana. En la apoptosis el proceso afecta a determinadas células, no necesariamente contiguas, y no a todas en un área tisular. La membrana celular no se destruye, lo que impide el escape al espacio extracelular de su contenido resultando un proceso sin estímulo inflamatorio. La apoptosis es una forma activa de muerte celular programada genéticamente en respuesta a señales externas o internas y se distingue de la necrosis por ser un proceso activo, ordenado, secuencial y autopromovido por la propia célula. Es un proceso que requiere un consumo energético en forma de Adenosín trifosfato (ATP), con disminución de la síntesis de ARN y proteínas y la pérdida de agua e iones, por lo que el citoplasma se condensa y aumenta la densidad celular. El ADN se fragmenta por rotura de la cadena en los nucleosomas, que aparece cada 180-200 pares de bases. Las células en apoptosis aparecen retraídas, con orgánulos preservados y vesiculación de la membrana produciéndose finalmente la rotura nuclear. Posteriormente la célula se rompe en forma de cuerpos apoptóticos que contienen fragmentos de citoplasma condensado y núcleo que son fagocitados por macrófagos o por células vecinas⁴⁷.

Genes	Características	Efecto sobre la apoptosis
c-myc	Factor de transcripción	Acelerador
p53	Gen supresor	Acelerador
bax	Estímulo de RLO	Acelerador
bcl-xs	Estímulo de RLO	Acelerador
bcl-2	Neutralización de RLO.	Supresor
bcl-xL	Neutralización de RLO.	Supresor
c-fes	Tirosin-quinasa	Supresor
v-abl	Tirosin-quinasa	Supresor

TABLA 6. ALGUNOS DE LOS PRINCIPALES GENES REGULADORES DE LA APOPTOSIS. MODIFICADO DE PARDO FJ⁴⁷.

Existen genes y sus proteínas correspondientes, estimuladores e inhibidores de la apoptosis. Los factores de crecimiento tisular que estimulan la proliferación o la diferenciación celular son inhibidores de la apoptosis. (Tabla 6).

6.2. Vías de activación de la apoptosis.

La apoptosis y la activación de las caspasas pueden tener lugar simultáneamente mediante dos vías principales, la vía mediada por receptores de superficie o “extrínseca” y la vía mediada por activación mitocondrial o “intrínseca”, que convergen en la fase final de la apoptosis para la activación de la caspasa-3 que es la efectora de la fase final de la apoptosis y la responsable de la segmentación proteolítica parcial o total de proteínas nucleares clave en diversos tipos celulares.

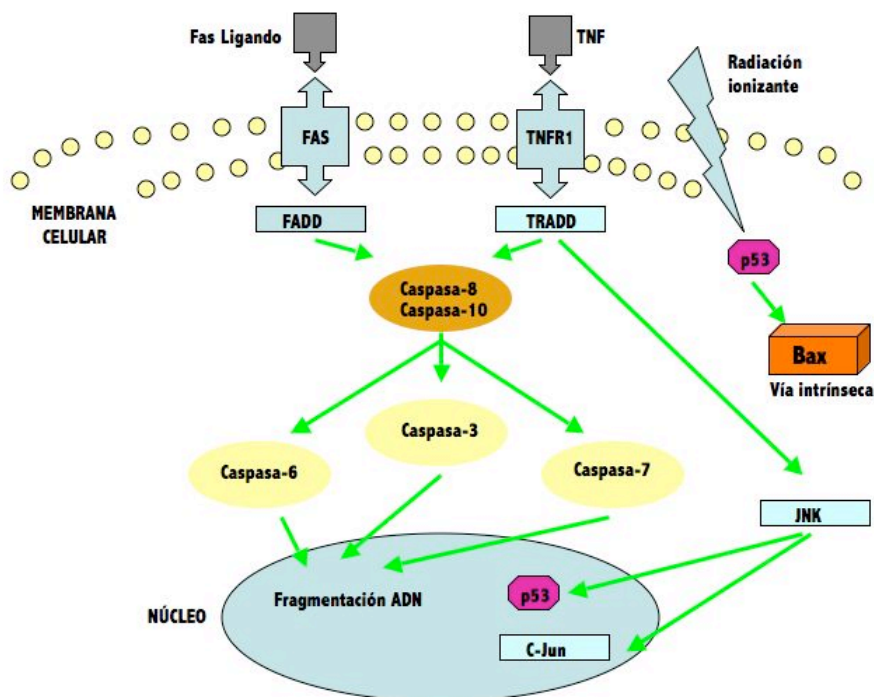


FIGURA 7. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ACTIVACIÓN DE LA APOPTOSIS POR LA VÍA EXTRÍNSECA.

La vía extrínseca de la apoptosis (figura 7) mediada por receptor de membrana, se inicia por la unión del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) al receptor 1 de TNF (TNFR1) que transmite la señal a través del dominio asociado a TNFR1 (TRADD), una molécula adaptadora, o por la activación de receptores de muerte celular de superficie como el Fas-ligando. Una vez que esta señal de inducción de muerte celular se forma, la proteína adaptadora se une a un iniciador como la procaspasa-8 o la procaspasa-10 que contienen los dominios efectores de muerte celular por la autoactivación de la cascada apoptótica. La activación de ambas caspasas 3 y 8 se ha observado en distintos tipos de daño celular⁴⁸.

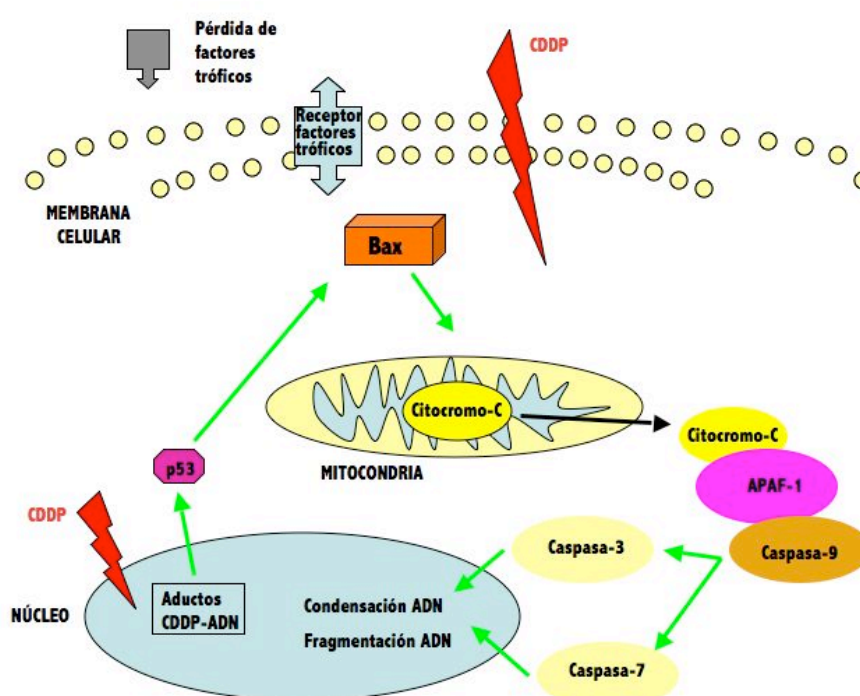


FIGURA 8. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ACTIVACIÓN DE LA APOPTOSIS POR LA VÍA INTRÍNSECA. CDDP: CISPLATINO. IAP: COMPLEJO DE PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE LA APOPTOSIS.

La vía intrínseca (también denominada mitocondrial) de la apoptosis, mediada por activación mitocondrial, se induce por el aumento de producción de moléculas de estrés celular tras un daño inespecífico (figura 8). La generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), de radical hidroxilo (OH^\cdot), u otros RLO como el óxido nítrico (NO) o el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) producen activación de la vía mitocondrial de la apoptosis. Además, la vía intrínseca puede ser regulada o potenciada por alteraciones

de la expresión de genes sintetizadores proteínas miembros de la familia del gen bcl-2 en forma de potenciación (bax, bad, bcl-xs) o inhibición (bcl-2, bcl-xL) y por genes como el p53⁴⁹. El mecanismo antiapoptótico del gen bcl-2 incluye la inhibición de la formación de RLO, el aumento del umbral de desencadenamiento de la apoptosis y la inactivación de la formación de caspasa-9 y por consiguiente de caspasa-3. Diversos estudios han demostrado la activación de las caspasas 8 y 9 (iniciadoras) y de caspasa-3 (efectora) en el daño celular isquémico. Existen formas de activación cruzada entre ambas vías⁵⁰⁻⁵⁶.

En las figuras 9 y 10 se muestran las principales vías de activación de la apoptosis en el oído interno mediadas por toxicidad debida al CDDP.

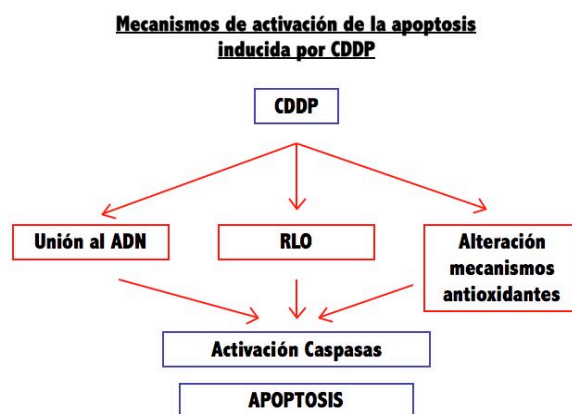


FIGURA 9. MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DE FENÓMENOS APOPTÓTICOS POR CDDP.

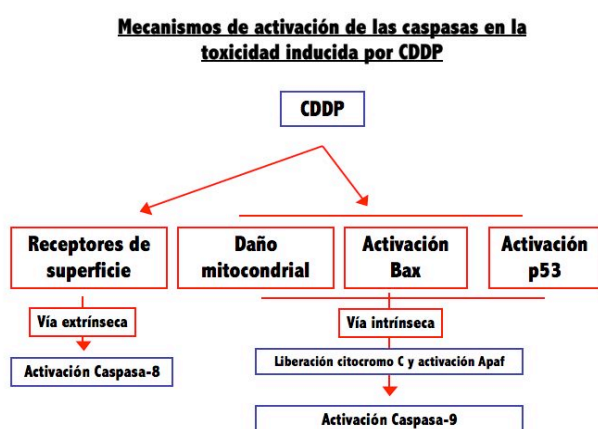


FIGURA 10. MECANISMOS DE ACTIVACIÓN INTRÍNSECOS Y EXTRÍNSECOS DE FENÓMENOS APOPTÓTICOS POR CDDP.

6.3. Mecanismos de activación e inhibición de las caspasas.

Las caspasas (cysteine dependent aspartate specific proteases) comprenden una clase de proteasas independientes del Ca^{2+} que forman el sustrato de una secuencia proteica implicada en la apoptosis celular. La familia de las caspasas se dividen en inflamatorias y apoptóticas, siendo las caspasas 1, 4, 5, 11, 12 y 13 del subtipo inflamatorio, las caspasas 2, 8, 9 y 10 iniciadoras y las caspasas 3, 6, 7 y 14 efectoras del subtipo apoptótico basándose en su localización dentro de las secuencias específicas productoras de la apoptosis⁵⁷⁻⁵⁹. De todas ellas la caspasa-3 parece ser la que juega un papel principal para la apoptosis celular en las lesiones del sistema nervioso central⁶⁰. Las caspasas se sintetizan como proenzimas inactivas y se van activando al ser segmentadas dentro de la cascada apoptótica en aminoácidos específicos, principalmente el aspartato. Esta especificidad del sustrato de unión de las caspasas se ha estudiado con gran detalle para desarrollar sustratos peptídicos sintéticos, inhibidores de la actividad de las caspasas, así como para predecir la preferencia por distintos sustratos celulares e inhibir su actividad. En mamíferos, 12 diferentes miembros de la familia de las caspasas y sus sustratos específicos se han definido.

Caspasa	Secuencia tetrapeptídica y lugar de segmentación*
Caspasa-1	Trp-Glu-His-Asp*
Caspasa-2	Asp-Glu-His-Asp*
Caspasa-3	Trp-Glu-Val-Asp*
Caspasa-4	Trp-Glu-His-Asp*
Caspasa-5	Trp-Glu-His-Asp*
Caspasa-6	Val-Glu-His-Asp*
Caspasa-7	Asp-Glu-Val-Asp*
Caspasa-8	Leu-Glu-Thr-Asp*
Caspasa-9	Leu-Glu-His-Asp*
Caspasa-10	Leu-Glu-X-Asp*
Caspasa-13	Trp-Glu-His-Asp*
Caspasa-14	Trp-Glu-His-Asp*

TABLA 7. ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE LAS CASPASAS EN MAMÍFEROS. MODIFICADO DE RAY SK⁶¹.

Como se puede observar en la Tabla 7, para una proteólisis eficiente, las caspasas requieren una secuencia tetrapeptídica $H_2N-(P4-P3-P2-P1)$ -terminal, teniendo lugar la activación tras el sustrato P1 que es invariablemente aspartato. Es interesante remarcar que el aminoácido en posición P3 de las caspasas es glutamato en todas las especies de mamíferos, siendo la secuencia típica resumida X-Glu-X-Asp.

7. Farmacología de los inhibidores de caspasas.

Las caspasas, al ser las más efectivas mediadoras de la apoptosis se han convertido en la principal diana para la regulación farmacológica de la neurodegeneración. La mayoría de los péptidos inhibidores de caspasas se han desarrollado basándose en el hecho de que la secuencia tetrapeptídica es suficiente para un reconocimiento específico y una unión de alta afinidad. La selectividad de los inhibidores de las caspasas se ha diseñado para imitar el sustrato específico de la caspasa correspondiente. Una primera generación de inhibidores con el terminal carboxílico (-COOH) demostraron poca utilidad por baja capacidad de penetrar la célula, pérdida de estabilidad molecular y baja actividad en células sanas. En la actualidad, el diseño sintético incluye un carbono terminal electrófilo tipo aldehído (-CHO) en el caso de una inhibición reversible o un terminal fluorometilcetónido (-FMK) para una interacción irreversible con el ligando activo Cis de la caspasa, que también utiliza una región péptidomimética que se une al sustrato de unión para inactivar la cascada enzimática⁶²⁻⁶³.

Los inhibidores de caspasas de segunda generación con un grupo cetónido (inhibición irreversible) son más estables y producen menor reactividad con otros sustratos que los inhibidores con un grupo aldehído (inhibición reversible) que además podrían limitar el uso clínico de los inhibidores de la apoptosis ya que los aldehídos tienden a formar bases tóxicas o a reaccionar de forma no específica con terminales Cis.

Los inhibidores sintetizados con un grupo benciloxicarboxilo (BOC- o Z-) en el N-terminal y cadena O-Metil han demostrado un aumento de la permeabilidad a través de la membrana celular, facilitando su uso en investigaciones en lisados tisulares, cultivo celular, *in vitro* e *in vivo*.

En el momento actual no hay evidencia científica de una mejoría de resultados con inhibidores reversibles o irreversibles o con sustratos más o menos específicos, pero sí parece que la inhibición reversible es más activa en la inflamación y la inhibición irreversible muestra mayor efectividad en apoptosis. Debido al hecho de una mejor permeabilidad de membrana en los inhibidores con grupo z- o benzocarboxilo y a la mejor tolerancia y efectividad en apoptosis de los inhibidores con grupo cetónido

hemos usado sólo inhibidores irreversibles de segunda generación para minimizar la actividad apoptótica en los animales expuestos a ototoxicidad por CDDP.

8. *Búsqueda de marcadores precoces de ototoxicidad por CDDP.*

Desde hace varios años se están realizando intentos en modelos experimentales y en humanos para la detección de marcadores precoces de daño en el oído interno.

Las proteínas de choque térmico (HSP) constituyen un grupo de proteínas intracelulares relacionadas con la síntesis proteica y la maduración de los tejidos en condiciones normales. Su expresión se induce por la exposición a diferentes agentes que produzcan un estrés celular y se las ha implicado en la protección celular frente a causas no necrotizantes de lesión. Se han identificado anticuerpos contra la HSP-70 en enfermedad inmunomediada del oído interno, infecciones víricas o bacterianas, esclerosis múltiple, y el estrés asociado a la hipertermia. Harris y Sharp⁶⁴ describieron la existencia de una elevación de anticuerpos séricos contra una proteína de 68 KDa en el Western-blot contra extractos de oído interno bovino. Posteriormente, se identificó esta proteína de 68 KDa con la HSP-70⁶⁵. La HSP-70 se propuso como un antígeno coclear subyacente a la enfermedad inmunomediada y a las HNS fluctuantes y rápidamente progresivas asociadas o no a fenómenos de hídrops coclear. Otras proteínas de este grupo como la HSP-72 (forma inducible y activa de la HSP-70) también se expresan en la cóclea de rata tras tratamientos con CDDP⁶⁶. Ramírez-Camacho *et al* fueron capaces posteriormente de demostrar la inexistencia de diferencias significativas respecto a la expresión de HSP-70 en pacientes controles y afectados de HNS inmunomediada, por lo que se inició la búsqueda de un modelo experimental de características controlables desde el exterior para valorar la expresión de HSP-70, siendo el modelo más válido hasta el momento el de la ototoxicidad por CDDP a dosis controladas. En el momento actual la HSP-70 parece actuar como un marcador serológico y local inespecífico de daño celular en el oído interno en respuesta a diversas causas, debiendo establecerse con claridad su papel dentro de la secuencia de eventos del daño tóxico por CDDP y su posible papel como marcador cualitativo de ototoxicidad por CDDP⁶⁷.

Hasta el momento, desde el punto de vista clínico, no se han encontrado otros marcadores de

ototoxicidad pero la aplicación de la AUAF ha abierto un campo para la detección precoz del daño en el oído interno en frecuencias que, aunque dañadas, no tienen influencia en la inteligibilidad del lenguaje. De momento su uso no se ha generalizado y permanece restringido a la investigación clínica⁶⁸. Así mismo las Otoemisiones acústicas se han propuesto como marcador precoz del daño en el oído interno, pero al ser una prueba para la detección de la lesión de las CCE, su afectación indica ya un estado avanzado de lesión coclear y su uso como marcador precoz está siendo abandonado⁶⁹⁻⁷⁰.

9. Técnicas de investigación en ototoxicidad.

Para el estudio de la ototoxicidad y sus mecanismos en el animal de experimentación se han utilizado distintas técnicas funcionales y morfológicas.

En primer lugar, para la cuantificación de la capacidad auditiva, se ha utilizado una técnica objetiva como son los PEATC. Mediante la estimulación sonora se recogen ondas de respuesta en el nervio auditivo y la vía auditiva identificables mediante un equipo específico, eliminándose los artefactos para la detección del *umbral auditivo mínimo* en el que la respuesta neural es objetivamente asimilable a una captación cerebral de sonido.

En segundo lugar para la detección cuantitativa de mecanismos de lesión en el oído interno hemos utilizado la técnica de Western-blot. Esta técnica permite la detección de proteínas en una muestra de un tejido homogeneizado o extracto utilizando anticuerpos específicos para la proteína. Como resultado, se pueden examinar la cantidad de proteínas en una muestra y comparar los niveles de presencia entre varios grupos, apoyándose en programas informáticos para la cuantificación de la cantidad de luminiscencia emitida por un grupo determinado de muestras.

En tercer lugar y para la localización anatómica de los procesos bioquímicos y metabólicos responsables de la ototoxicidad en el oído interno hemos precisado la utilización de técnicas de microscopía electrónica de barrido y de técnicas de inmunohistoquímica

Desde que el gen de la luciferasa, procedente de la luciérnaga (*Photinus pyralis*), se introdujo en la biología molecular, éste ha proporcionado un método para utilizar la producción biológica de luz como un instrumento para la investigación. Esta luminiscencia permite la realización de experimentos científicos con una fuente altamente sensible y no radioactiva. La luciferasa de la luciérnaga constituye hoy en día la principal fuente de medición de la expresión génica. La cantidad de bioluminiscencia (actividad de la luciferasa) corresponde a la intensidad de transcripción del ADN, mutaciones en los

elementos de ADN, o respuesta a señales intracelulares y extracelulares. En el caso del presente trabajo, corresponde a la expresión de una determinada proteína.

El uso combinado en las mismas muestras de técnicas que permiten cuantificar la pérdida auditiva y de técnicas que permiten no sólo medir, sino también localizar los distintos procesos metabólicos que influyen en la ototoxicidad a productos platinados, permiten abrir una vía de investigación microanatómica para una futura prevención de la pérdida auditiva asociada a la quimioterapia por CDDP.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

- 1.- Relacionar la administración de CDDP con la pérdida auditiva de la rata Sprague-Dawley (SD).
- 2.- Determinar las vías de activación de la apoptosis en la cóclea de rata SD en un modelo experimental de ototoxicidad por CDDP caracterizando los mecanismos responsables de la muerte celular en el oído interno.
- 3.- Correlacionar la disfunción auditiva inducida por CDDP con las alteraciones intracelulares.
- 4.- Determinar el papel de la HSP-70 en la mediación y protección del daño producido por CDDP en un modelo de ototoxicidad.
- 5.- Valorar la prevención del daño auditivo mediante inhibidores de caspasas tras la aplicación de CDDP.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.Introducción.

Hemos examinado los cambios en los fenómenos apoptóticos y en la actividad de la HSP-70 en la cóclea de rata SD, usando técnicas cuantitativas e inmunohistoquímicas, y relacionando los resultados con estudios electrofisiológicos tras la administración bajo anestesia general inhalatoria (figura 11) de dosis de CDDP intraperitoneal bioequivalentes a las empleadas en la clínica humana (5 mg/Kg de peso en una dilución de CDDP de 1 mg/ml) frente a los hallazgos en grupos control.



FIGURA 11. SISTEMA PARA ANESTESIA GENERAL INHALATORIA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN DE PEQUEÑO TAMAÑO.

2. Consideraciones éticas.

Los animales fueron sacrificados siguiendo las recomendaciones éticas actuales recogidas en la literatura internacional⁷¹, la Directiva Europea 86/609/CEE y reguladas en España por el [Real Decreto 1201/2005](#), de 10 de octubre de 2005, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos⁷² y la ley 32/2007, del 8 de noviembre de 2007 para el cuidado de animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio⁷³.

Los ensayos han sido aprobados por el comité de ética e investigaciones clínicas del Hospital Universitario Puerta de Hierro (Expediente PI 05 0673, de 28 de Junio de 2005).

3. Animales de experimentación.

Se utilizaron 70 ratas SD hembras (Harlan Ibérica, Barcelona, España) de entre 180 y 280 g de peso. Además, para el estudio de la HSP-70 se utilizaron 54 ratas Wistar machos (Harlan Ibérica, Barcelona, España) de entre 200 y 300 g de peso. Tras el transporte los animales se mantuvieron en el animalario de nuestro centro durante al menos una semana. Todos los animales se guardaban en cajas de plástico con agua y comida a demanda, y fueron mantenidos en un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad. No se observó en ningún caso infección de oído medio. La ingesta hídrica y de sólidos de los animales fue vigilada para prevenir un déficit de nutrientes.

Los animales se dividieron en grupos para:

- 1.- la caracterización de la apoptosis inducida por CDDP,
- 2.- la determinación del papel de la HSP-70 como marcador y modulador de la apoptosis en el oído interno y
- 3.- la determinación de la capacidad de inhibición de la apoptosis mediante inhibidores de caspasas.

4. Cálculo del umbral de audición mediante PEATC.

Antes de comenzar se realizó otoscopia y reflejo de Preyer para confirmar la normalidad del oído medio⁷⁴⁻⁷⁵. Los umbrales auditivos por PEATC se obtuvieron en estado basal y antes del sacrificio en cada uno de los experimentos realizados (figura 12). Las ratas se anestesian con una solución de Ketamina 50mg/ml a razón de 150 mg/Kg de peso y Diacepam 1mg/ml para una dosis de 10 mg/Kg de peso en inyección intraperitoneal. La colocación de los electrodos platinados de aguja se realiza según describen Hatzopoulos *et al*⁷⁶ colocando el electrodo positivo en vértex, el negativo en la mastoides del oído estimulado y el electrodo de referencia en la mastoides del oído contralateral con lo que conseguimos ondas estables y reproducibles. El estímulo se establece a 8 KHz de frecuencia a razón de 10 estímulos por segundo de forma monoaural mediante transductor sonoro directo al canal auditivo externo en intensidades con decrecimiento progresivo desde 80 decibelios de pérdida sonora (dBHL) hasta el umbral mínimo auditivo en que la onda V es distinguible con una sensibilidad prefijada en todos los casos a 2µv tras promediar 1.500 estímulos válidos con el programa informático Medelec Synergy (Oxford Instruments Medical, Inc. Abingdon, Oxfordshire, Reino Unido).

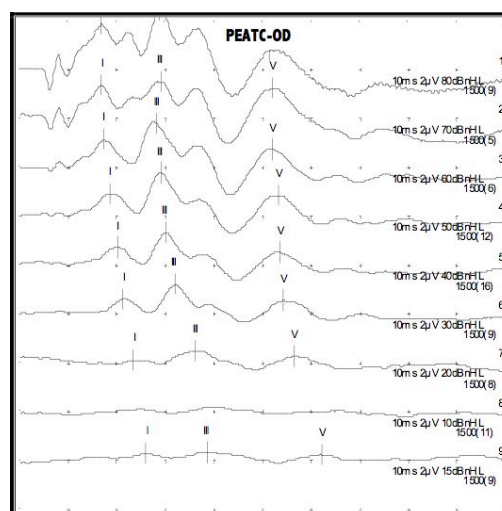


FIGURA 12. POTENCIALES EVOCADOS AUDITIVOS DE TRONCO CEREBRAL EN EL OÍDO DERECHO DE UNA RATA SPRAGUE-DAWLEY SANA. NÓTESE EL UMBRAL AUDITIVO MÍNIMO A 15 dBHL.

5. Preparación de las muestras.

Las muestras se mantuvieron en todo momento en condiciones fisiológicas, esto es, embebidas en solución salina o fijador, y los cambios de reactivos se realizaron en condiciones que garantizan la menor artefactación posible de las muestras.



FIGURA 13. EXTRACCIÓN DEL HUESO TEMPORAL TRAS DECAPITACIÓN EN CONDICIONES DE ASEPSIA CON LA AYUDA DE PERSONAL DE QUIRÓFANO EXPERIMENTAL Y MICROSCOPIO BINOCULAR QUIRÚRGICO.

En condiciones de esterilidad (figura 13) y tras la decapitación y extracción en fijador del hueso temporal derecho se procede a la exposición de la bulla timpánica, (figura 14) a su apertura (figura 15) y se realiza una estapedectomía (figura 16). Tras desplazar superiormente la arteria estapedial (figura 17) se realiza una perforación de las ventanas oval y redonda y se procede a la perfusión intralabérntica suave y cuidadosa de aproximadamente 0'1 ml de Paraformaldehído al 4% en solución de suero salino tamponado con fosfato (PBS) 0'1M a un pH de 7'4 (figura 18). Posteriormente se mantienen las cócleas durante dos horas a temperatura ambiente en Paraformaldehído al 4% en PBS 0'1 M a un pH de 7'4.

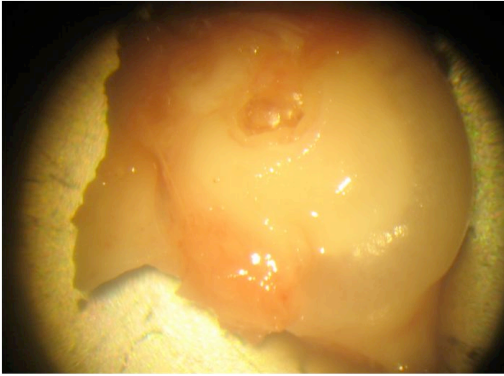


FIGURA 14. EXPOSICIÓN DE LA BULLA TIMPÁNICA TRAS RETIRADA DE MÚSCULOS PERIAURICULARES Y CERVICALES Y DE LOS CARTÍLAGOS DEL PABELLÓN Y CONDUCTO AUDITIVOS.

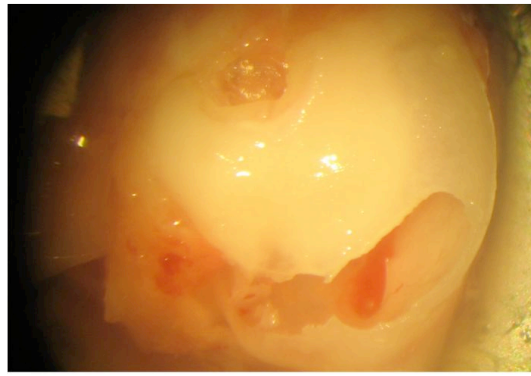


FIGURA 15. APERTURA PARCIAL DE LA BULLA TIMPÁNICA PARA ACCEDER A LA CAVIDAD EN LA QUE SE ALOJA EL OÍDO INTERNO

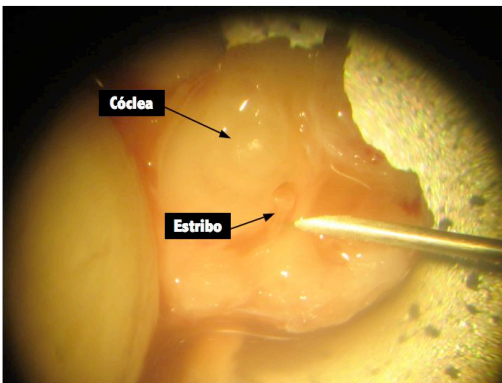


FIGURA 16. ESTAPEDECTOMÍA CON AGUJA SUBCUTÁNEA.

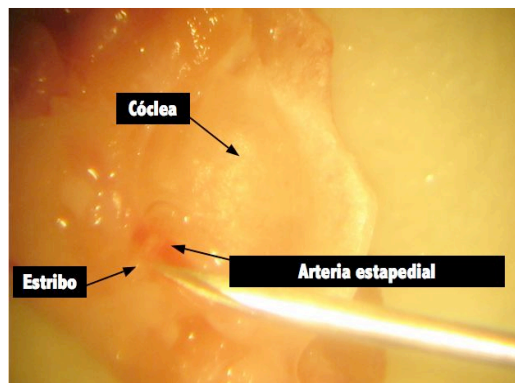


FIGURA 17. EXTRACCIÓN DE LA ARTERIA ESTAPEDIAL PARA UN MEJOR ACCESO A LA VENTANA OVAL

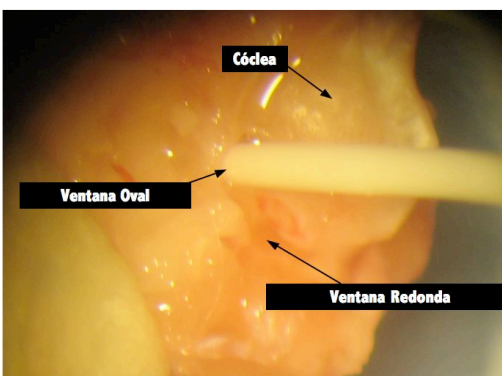


FIGURA 18. PERFUSIÓN INTRALABERÍNTICA CUIDADOSA DE PARAFORMALDEHÍDO AL 4% A TRAVÉS DE LA VENTANA OVAL HASTA SU SALIDA A TRAVÉS DE LA VENTANA REDONDA.

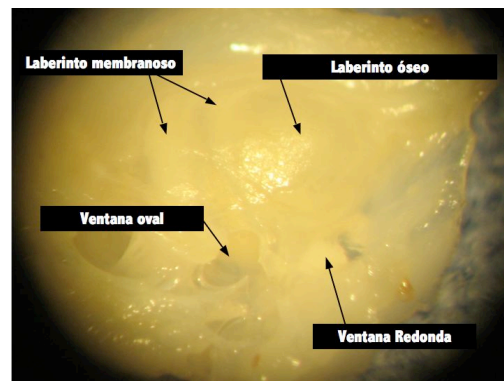


FIGURA 19. PROCESO DE DESCALCIFICACIÓN EN SOLUCIÓN DE EDTA A LAS 2 SEMANAS. NÓTESE LA VISIBILIDAD DEL LABERINTO MEMBRANOSO A TRAVÉS DE LA PARED ÓSEA PARCIALMENTE DESCALCIFICADA.

Transcurridas dos horas se realizan 4 lavados de 15 minutos en PBS 0'1M a un pH de 7'4 para que las muestras sean embebidas en una solución 0'3M de (EDTA) en 0'1M de PBS realizando cambios diarios de la solución de EDTA hasta la total descalcificación del tejido óseo que demora aproximadamente 3 semanas (figura 19).

Una vez descalcificadas las cócleas derechas se lavan 8 veces más en PBS 0'1M en ciclos de 15 minutos, posteriormente dos lavados más de 20 minutos en solución Alcohol-Xilol estándar y son embebidas en parafina líquida durante 24 horas manteniéndolas colocadas en una posición que permita realizar los cortes histológicos en la forma requerida (figura 20), en nuestro caso, cortes a lo largo del eje longitudinal de la cóclea, es decir, cortes mediomodiolares de 5 μ m que se montan en portaobjetos cubiertos de Poli-L-Lisina tras retirar la parafina en diluciones decrecientes de etanol del 100 al 70%, usándose uno de cada cinco cortes para estudio inmunohistoquímico.



FIGURA 20. CÓCLEAS DERECHAS ORIENTADAS Y EMBEBIDAS EN PARAFINA PARA LA REALIZACIÓN DE CORTES MEDIOMODIOLARES.

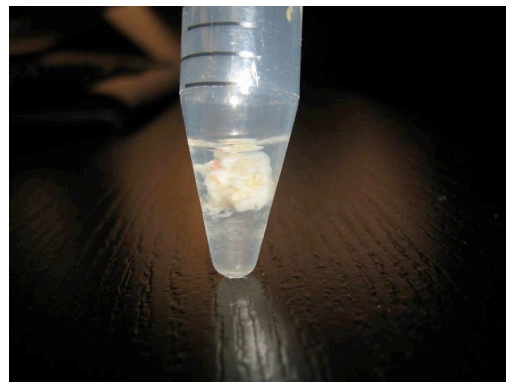


FIGURA 21. CÓCLEAS IZQUIERDAS EMBEBIDAS EN UNA SOLUCIÓN TAMPONADA Y CON REACTIVOS DE EXTRACCIÓN PROTEICA E INHIBIDORES DE PROTEASAS.

Las cócleas izquierdas son seleccionadas para su lisado y obtención de un extracto proteico completo de cóclea (figura 21) y mantenidas en congelación a -4°C hasta su utilización para cuantificación de proteínas apoptóticas, determinación de agentes antioxidantes, cuantificación de expresión de caspasas y de agentes platinados. Constituyen una reserva para futuras comprobaciones y estudios.

6. Preparación para inyección intraperitoneal de inhibidores de la actividad apoptótica.

Se prepararon dosis alícuotas para la inyección intraperitoneal bajo anestesia general con Isoflurano (Forane®) de una dosis diaria de 5 mg/Kg de inhibidor de la actividad apoptótica en un ciclo de 3 días, en el día -1, 0 y +1 de la inyección de CDDP o cloruro sódico (NaCl) al 0'9%. Todas las dosis fueron preparadas en el mismo momento y congeladas a -20°C, descongelando solamente las dosis diarias necesarias para evitar la congelación y descongelación repetida de la solución de inhibidores (figura 22). Los inhibidores poseen un tiempo de actividad a temperatura corporal de aproximadamente 20 horas, pudiendo mantener sus propiedades en congelación a -20°C durante un máximo de 6 meses.



FIGURA 22. PREPARACIÓN DE LAS DOSIS ALÍCUOTAS PARA SU INYECCIÓN EN EL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN. NÓTESE EL PROCESO PARCIAL DE DESCONGELACIÓN DE UNA ÚNICA DOSIS DE CADA INHIBIDOR.

Inhibidores de la actividad apoptótica utilizados en el presente trabajo:

Inhibidor de la caspasa 9. (Figura 23).

Z-LEHD-FMK (inhibidor de la caspasa-9. Vía extrínseca)

Dilución a 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) al 99,9%. Se inyecta una cantidad de 5 mg/Kg de la dilución de Z-DEVD-FMK en DMSO.

Secuencia:

Z-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-FMK o Z-LE(OMe)HD(OMe)-FMK

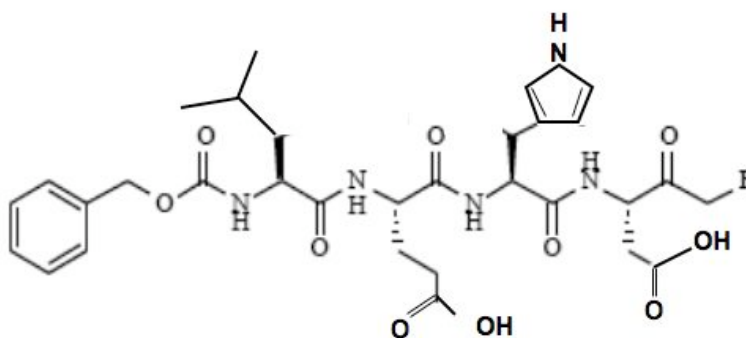


FIGURA 23. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL INHIBIDOR Z-LEHD-FMK.

Inhibidor de la caspasa 3. (Figura 24).

Z-DEVD-FMK (inhibidor del complejo de caspasas-3/7. Vía intrínseca y efectora)

Dilución a 10 mM en DMSO al 99,9%. Se inyecta una cantidad de 5 mg/Kg de la dilución de Z-DEVD-FMK en DMSO.

Secuencia:

Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-FMK o Z-D(OMe)E(OMe)VD(OMe)-FMK

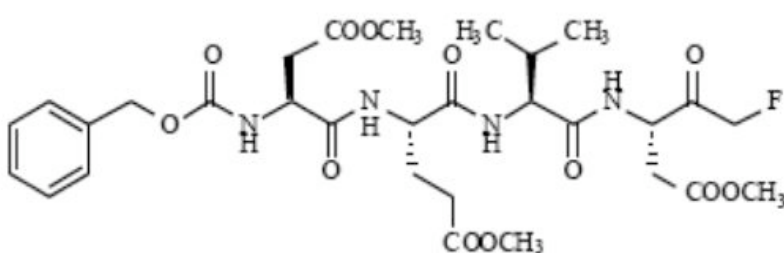


FIGURA 24. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL INHIBIDOR Z-DEVD-FMK.

7. Caracterización de la apoptosis inducida por CDDP en la cóclea de rata SD.

7.1. Western Blot y contenido proteico.

La extracción de homogeneizado proteico y el Western-Blot se realizaron siguiendo la técnica descrita previamente en 2003 por Peiró *et al*⁷⁷. (Figura 25). Tras lavado en PBS, células cultivadas de músculo liso de peritoneo (HPMCs) fueron extraídas tras lisado celular en solución tamponada de 10mM Tris a pH 7'4, 1% dodecilsulfato de sodio (DSS) 10 mM ortovanadato, 2mM de metilfenilsulfonil fluoruro (MSFF) y 12'5µg/ml de aprotinina. Los extractos proteicos totales fueron diluidos en proporción 3:1 en Tampón de Laemmli y hervidos 5 minutos a 100°C. Las proteínas fueron cargadas de manera idéntica (10 µg por línea) separadas en geles de electroforesis de poliacrilamida con 8% DSS y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Laboratorios Bio-Rad, Madrid, España).

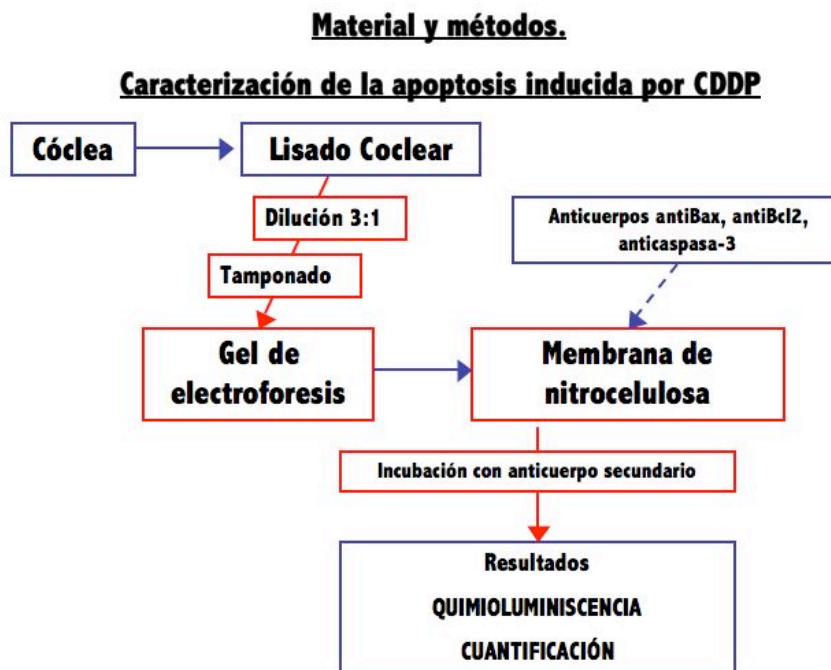


FIGURA 25. PROCESO DE TRATAMIENTO DE LAS CÓCLEAS IZQUIERDAS PARA ESTUDIO DE EXPRESIÓN PROTEICA.

Tras dejar formar los bloques de gel durante una noche a 4°C en Tween-20 al 0'2% y solución al 5% de leche desnatada deshidratada, se incubó la membrana de nitrocelulosa durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos policlonales contra la proteína-2 del linfoma de células B (Bcl-2), y anticuerpos monoméricos contra proteína X asociada al Bcl-2 (Bax) o proteína caspasa 3 activada, (Ab 7973, dilución 1/200; Ab 16837, dilución 1/200; y Ab 13847, dilución 1/200 respectivamente de Abcam, Cambridge, Reino Unido) seguido de incubación durante 45 minutos con su respectivo anticuerpo secundario antiperoxidasa de rábano de ratón o de conejo (dilución 1/10.00 de Abcam, Cambridge, Reino Unido). Las bandas de inmunorreactividad se detectaron usando el *kit* de aumento de quimioluminiscencia (Amersham, Arlington Hills, Illinois, Estados Unidos de América), y fueron cuantificadas usando el *software* Chemi-Imager 5.5 de AlphaInnotech (San Leandro, California, Estados Unidos de América). El análisis densitométrico es representativo de la media de los resultados de cuatro experimentos.

7.2 Análisis inmunohistoquímico para la detección morfológica de apoptosis asociada a la caspasa-3.

Los resultados inmunohistoquímicos podrían contribuir a ilustrar el papel de la Caspasa-3 en el efecto tóxico producido por CDDP en las distintas poblaciones celulares del oído interno. (Figura 26). Para el análisis de inmunofluorescencia las muestras desparafinadas fueron incubadas con anticuerpos contra la proteína activa de la caspasa-3. Tras incluir la muestra en una solución de Ácido Cítrico 0'1M con Citrato de Sodio 0'1M en agua bidestilada se calienta con microondas. Los especímenes son lavados y perfundidos con solución PBS 0'1M, Tween 20 al 0'3% y solución de Suero de Albúmina Bovino (BSA) al 5% durante 60 minutos a 37°C.

Tras ello los cortes seleccionados se incuban con anticuerpos anticaspasa-3 (Ab 13847, dilución 1/200 de Abcam, Cambridge, Reino Unido) diluidos en PBS y BSA al 1% durante 60 minutos a

37°C. El anticuerpo secundario Alexa Fluor 546® (Molecular Probes/Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) se añadió durante 45 minutos a 37°C.

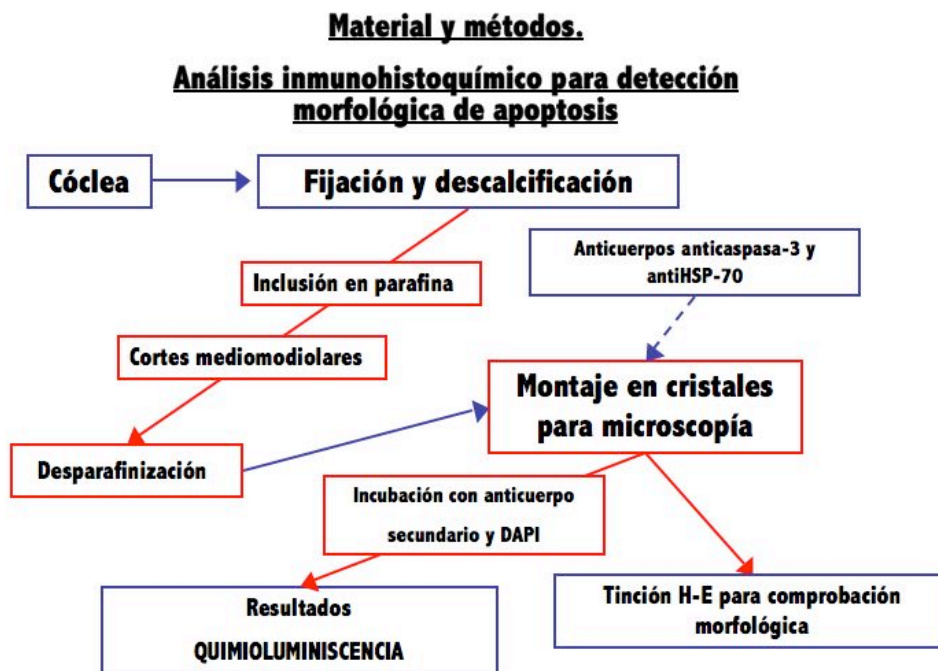


FIGURA 26. PROCESO DE TRATAMIENTO DE LAS CÓCLEAS DERECHAS PARA EL ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA APOPTOSIS Y DE LA EXPRESIÓN DE LA HSP-70 EN LAS DISTINTAS POBLACIONES CELULARES DEL OÍDO INTERNO.

Las muestras fueron embebidas en Moviöl 4-88 (Hoechst Pharmaceuticals, Frankfurt, Alemania) y suplementadas con 300 nM de 49, 6-diamidin-2-fenilindol (DAPI) para ser observadas con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX-51 (Olympus, Tokio, Japón). Todas las muestras de tejido fueron teñidas previamente para visualización morfológica con hematoxilina-eosina.

7.3 Medida de la actividad de las diferentes caspasas para la determinación de la vía apoptótica predominante .

La cóclea izquierda fue utilizada para la cuantificación de la actividad de las diferentes caspasas implicadas en la cascada apoptótica. Por tanto, los extractos completos proteicos de cóclea fueron obtenidos con reactivos de extracción de proteínas de mamíferos (Pierce, Rockford, Illinois, Estados

Unidos de América) asociando una mezcla de inhibidores de proteasas en fresco (Boehringer, Mannheim, Alemania) como se había descrito previamente por Nevado *et al*⁷⁸. El homogeneizado fue tratado sin sensibilización previa durante 3 minutos con el homogeneizador Ultra-Turrax T8 (IKA, Staufen, Alemania), seguido de enfriamiento durante 1 minuto en hielo. Esta parte de la preparación se repitió por dos veces. El extracto lisado fue aclarado por centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C para precipitar las escamas celulares y el sobrenadante fue usado inmediatamente o congelado a -80°C. La concentración proteica se determinó mediante ensayo proteico con Ácido Bicinonínico (BCA) (Pierce, Rockford, Illinois, Estados Unidos de América). La cuantificación de la actividad de las diferentes caspasas se usaron distintos reactivos luminiscentes (Caspase-Glo 3/7; Caspase-Glo 8 y Caspase-Glo 9, Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos de América) usando en todo momento las recomendaciones del fabricante. Cada reactivo provee un sustrato luminiscente específico que contiene la secuencia tetrapeptídica DEVD para caspasas 3/7, LETD para caspasa 8 y LEHD para caspasa 9, que han demostrado ser específicas para caspasa 3/7, caspasa 8, y caspasa 9 respectivamente⁷⁹. La luminiscencia es proporcional a la cantidad de la actividad de las caspasas presentes usando como medida para la normalización la cantidad de 10 µg de proteína.

7.4 Cuantificación de los niveles de ATP.

Para la medición de la cantidad total de ATP en el extracto proteico total de cóclea de rata SD se usó el CellTiter-Glo Reagent® (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos de América). La cantidad de referencia fue también en este caso 10 µg de proteína.

7.5 Medición de la actividad total de la superóxido dismutasa. (SOD)

Para analizar la actividad total de la enzima antioxidante SOD en la ototoxicidad generada por CDDP, se midió su actividad con el *SOD Activity Kit*® (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, Estados Unidos de América) en el extracto coclear completo de rata mediante colorimetría. Este *kit* mide los tres tipos de SOD (Cu/Zn-; Mn-; y Fe-SOD) y usa una sal de *tetrazolium* para la detección del radical superóxido generado por la Xantina oxidasa y la hipoxantina en los homogeneizados de tejido coclear. La actividad de la SOD se estandariza usando un ensayo bicontrolado con Citocromo C oxidasa y Xantina oxidasa. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para mostrar un 50% de conjugación del radical superóxido.

8. *Expresión y cuantificación en tejido coclear de la HSP-70.*

Para el análisis por inmunofluorescencia se retira la parafina de las secciones cocleares y se incuban con anticuerpos contra la HSP-70. (Figura 26). Posteriormente se embeben en buffer citrato (0'1M de ácido cítrico y 0'1M de citrato sódico en agua bidestilada) y se calientan en microondas. Las muestras se lavan e incuban con PBS 0'1M, Tween 20 al 0'3% y BSA. Posteriormente se incuban con anticuerpo antiHSP-70 (Dilución AB) diluido en BSA al 1% en PBS durante 60 minutos a 37 °C. Se añadió un anticuerpo secundario Alexa Fluor® 546 (dilución 1/1500) (Molecular Probes/Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) durante 45 minutos a 37 °C. Las muestras fueron embebidas en Moviöl 4-88 (Hoechst Pharmaceuticals, Frankfurt, Alemania) y suplementadas con 300 nM de 49, DAPI para ser observadas con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX-51 (Olympus, Tokio, Japón). Todas las muestras de tejido fueron teñidas para visualización morfológica con hematoxilina-eosina en alguno de sus cortes como comprobación de la correcta orientación y presencia de tejidos blandos del órgano de Corti. Tras dejar formar los bloques de gel durante una noche a 4°C en Tween-20 al 0'2% y solución al 5% de leche desnatada deshidratada, se incubó la membrana de nitrocelulosa durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos monoclonales contra HSP-70 (Ab2787, dilution 1/200, AbCam, Cambridge, Reino Unido) seguido de incubación durante 45 minutos con su respectivo anticuerpo secundario antiperoxidasa de rábano de ratón o de conejo (dilución 1/10.00 de Abcam, Cambridge, Reino Unido). Las bandas de inmunorreactividad se detectaron usando un *kit* de aumento de quimioluminiscencia (Amersham, Arlington Hills, Illinois, Estados Unidos de América), y fueron cuantificadas usando el *software* Chemi-Imager 5.5 de AlphaInnotech (San Leandro, California, Estados Unidos de América). El análisis densitométrico es representativo de la media de los resultados de cuatro experimentos.

9. Detección en sangre periférica de la HSP-70.

La presencia o ausencia de HSP-70 en el suero del animal de experimentación se determina de manera cualitativa con un método rápido para la detección del daño en el oído interno en casos de alta probabilidad de toxicidad en previsión de su posible uso en humanos como marcador serológico.

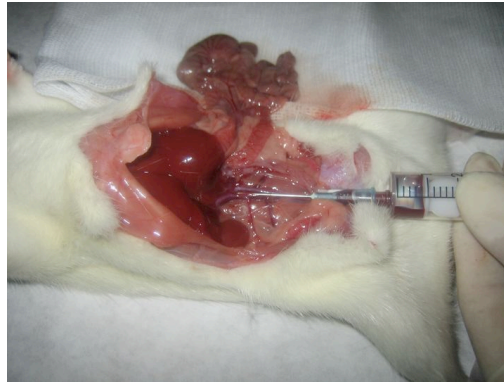


FIGURA 27. EXTRACCIÓN DE 2 ML DE SANGRE PERIFÉRICA DE LA VENA CAVA INFERIOR DE LA RATA SPRAGUE-DAWLEY PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTIHSP-70.

El análisis se realizó tras extracción de 2 ml de sangre de la vena cava inferior del animal anestesiado (figura 27) mediante Western-blot para la detección e identificación de anticuerpos contra la proteína de 68 kDa asociada con la HNS inmunomediada (OTOblot[®] anti-68kDa [HSP-70] Inner Ear Antibodies, IMMCO diagnostics, Buffalo, NY, Estados Unidos de América). Como el *kit* está diseñado para el reconocimiento del antígeno de la HSP-70 humano se ha modificado el protocolo recomendado por el fabricante mediante la incubación durante 1 hora con suero de rata en una dilución 1:101 de las tiras reactivas que contienen el antígeno. Tras el lavado se incuban con un conjugado F(ab)'2 de conejo antifosfatasa alcalina de rata a una dilución 1:10000. (Serotec, Raleigh, NC, Estados Unidos de América) durante 30 minutos.

10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante los programas Stat-View Statistics (Abacus Concepts, Inc. Berkeley, California, Estados Unidos de América) para el análisis de la expresión proteica y SPSS (SPSS, Inc. Chicago, Illinois, Estados Unidos de América) para el análisis de la capacidad auditiva. Las diferencias en la Media y la Desviación estándar (DE) o en la varianza fueron evaluadas mediante el test de análisis de varianza (ANOVA), seguido del test de probabilidad exacta de Fisher con un nivel de significación de p menor o igual de 0'05.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Trabajo	Objetivo	Material y Métodos	Resultados	Conclusiones
1. <i>Alteraciones morfológicas y celulares asociadas a la ototoxicidad por CDDP¹²².</i>	Demostración morfológica de las alteraciones por CDDP en el órgano de Corti	Búsqueda bibliográfica. MEB.	Poblaciones celulares distintas a las CCE tienen un papel predominante en distintos tipos de lesiones del oído interno	Papel predominante de poblaciones celulares accesorias al órgano de Corti como son las células de soporte
2. <i>Modelo experimental de ototoxicidad y caracterización de la apoptosis por Cisplatino¹¹⁹.</i>	Búsqueda de fenómenos apoptóticos y sus vías de activación en el órgano de Corti tras tratamiento con CDDP	Estudio de parámetros relacionados con apoptosis a las 48 horas, los 7 días y los 30 días de la administración de CDDP	La vía intrínseca es la efectora de la ototoxicidad por CDDP la cual es más evidente a los 7 días.	La vía intrínseca es la propiciatoria de la apoptosis en el oído interno. Las células de soporte y de la pared lateral son iniciadoras de ototoxicidad.
3. <i>Modelo experimental de inhibición de la apoptosis por Cisplatino en el oído interno.</i>	Inhibición de la apoptosis inducida por CDDP en el órgano de Corti mediante inhibidores de caspasas	Estudio de mecanismos apoptóticos a los 7 días de la administración de CDDP con y sin inhibidores de caspasas	Los inhibidores de las caspasas efectoras son más protectores frente al CDDP que los de la vía intrínseca.	Posibilidad de inhibición de la apoptosis centrada en las caspasas efectoras
4. <i>La HSP-70 como marcador precoz de ototoxicidad por Cisplatino⁶⁷.</i>	Búsqueda de marcadores precoces de ototoxicidad inducida por CDDP	Búsqueda de marcadores de ototoxicidad a los 7 y 90 días de la administración de CDDP	A los 7 días de la administración de CDDP la HSP-70 puede predecir afectación del oído interno.	La HSP-70 es un marcador inespecífico precoz de daño coclear inducido por CDDP
5. <i>La HSP-70 como mediador de la apoptosis inducida por Cisplatino.</i>	Valorar el papel de la HSP-70 como mediador de la apoptosis inducida por CDDP en el órgano de Corti	Estudio morfológico y cuantitativo de la apoptosis en relación a la expresión de HSP-70 en cóclea y sangre periférica.	La expresión de la HSP-70 se correlaciona con la activación de la apoptosis a los 7 días de la administración de CDDP.	La HSP-70 forma parte de un mecanismo endógeno antiapoptótico.

TABLA 8. RESUMEN DE LA SECCIÓN EXPERIMENTAL. MEB: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO. CDDP: CISPLATINO. CCE: CÉLULAS CILIADAS EXTERNAS. HSP-70: PROTEÍNA DEL CHOQUE TÉRMICO-70.

1. Caracterización del problema.

Alteraciones morfológicas y celulares asociadas a la ototoxicidad por CDDP.

Trabajo 1. Central role of supporting cells in cochlear homeostasis and pathology. Medical Hypotheses 2006;67:550-5.

1.1. Material y métodos:

Este trabajo constituye una revisión bibliográfica de los principales hallazgos en la confirmación de la teoría experimental de que las células ciliadas no constituyen la única población celular implicada en los mecanismos de daño celular al oído interno durante la ototoxicidad por CDDP y que en los principales mecanismos tóxicos influyen poblaciones celulares accesorias del órgano de Corti como las células de soporte.

1.2. Hipótesis de trabajo:

Recientes y contrastadas evidencias sobre la estructura y funcionalidad de las células de soporte han cambiado el concepto de la fisiopatología del órgano de Corti. Las células de soporte tienen un papel fundamental en los eventos degenerativos y regenerativos de las células sensoriales del oído interno que podrían tener una aplicación futura para el tratamiento de las patologías específicas del órgano de Corti como la ototoxicidad por agentes platinados, la HNS autoinmune y las hipoacusias de origen genético además de proveer una base para la regeneración de las células ciliadas. Este trabajo sirvió para cambiar el paradigma de la lesión preferencial e inmediata de las CCE en la ototoxicidad por CDDP y permitió iniciar dos líneas de investigación para la determinación de los fenómenos de acumulación y aclaramiento de drogas platinadas en órganos diana y de los fenómenos de regulación de la apoptosis relacionados con la ototoxicidad por CDDP.

1.3. Resultados:

En estudios recientes se ha evidenciado el valor de las células de soporte en el mantenimiento de la homeostasis del oído interno y en algunas patologías específicas que afectan al órgano de Corti.

Tabla 9.

PAPEL DE LAS CÉLULAS DE SOPORTE EN LOS TRASTORNOS DEL OÍDO INTERNO				
Homeostasis de las células ciliadas	Sorderas genéticas	Enfermedad autoinmune del oído interno	Ototoxicidad por Cisplatino	Regeneración de las células ciliadas
Profusión de mitocondrias y enzimas creatinkinasa.	Presencia de OCP1 y OCP2 (diana de la conexina 26)	Péptido de Cogan/antígeno KHRI-3	Proteínas de peso molecular similares a OCP1 y OCP2	Expresión del gen 27 Kip1
Mantenimiento de potencial endococlear y de la concentración de K^+	Aclaramiento del exceso de K^+	Receptor de glucocorticoides	Acumulación de Cisplatino en las células de Deiters	Presencia de células madre neurales adultas en embriones

TABLA 9. PAPEL DE LAS CÉLULAS DE SOPORTE EN DISTINTAS ENFERMEDADES DEL OÍDO INTERNO. OCP: PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DEL ÓRGANO DE CORTI. K^+ : POTASIO.

1.3.1. Ultraestructura de las células de soporte: Implicaciones metabólicas en la homeostasis del oído interno.

El plasmalema medial de las células de Deiters envuelve al nervio, y la porción en forma de copa apical está en íntimo contacto con la membrana plasmática basal de la CCE suprayacentes o la región sináptica. La asociación de las células de Deiters con el nervio auditivo en su primera neurona sugiere un papel similar al de la glía neural para dirigir el flujo de potasio (K^+) hacia la neurona y para mantener una concentración constante de K^+ que permita una despolarización efectiva⁸⁰. El retículo tubular de las células de Deiters parece estar destinado a facilitar la reabsorción de K^+ y actuar como reservorio evitando así su acumulación en el túnel externo a un nivel tóxico para las células sensoriales⁸¹. El

compartimento basal contiene un citosol carente de organelas y rico en elementos estructurales de soporte mientras que la porción apical contiene abundancia de mitocondrias⁸² atestiguando la alta capacidad energética para un uso intenso de la alta cantidad de enzima creatinkinasa, lo cual supone un papel biológico y bioquímico además de una función puramente estructural⁸³. En el plano nuclear la dispersión de la cromatina sugiere una alta tasa de transcripción no típica en células con una función puramente estructural.

1.3.2. Proteínas específicas del órgano de Corti OCP1 y OCP2.

Las proteínas específicas del órgano de Corti como las OCP1 y OCP2 son candidatas para una disfunción órgano-específica y se expresan únicamente en el sistema auditivo⁸⁴. En estudios inmunohistoquímicos se ha detectado su presencia en las células de soporte pero no en las CCE o en las CCI. Esta distribución coincide con la encontrada para las uniones *gap* dependientes del sistema de la conexina 26⁸⁵. La relación entre las mutaciones del gen de la conexina 26 y la patogenia de las sorderas genéticas no sindrómicas ha permitido aumentar el interés del sistema de uniones *gap* y su implicación en el mantenimiento del equilibrio iónico (principalmente el aclaramiento del K⁺), del potencial endolinfático y del pH intra y extracelular⁸⁶.

1.3.3. Autoanticuerpos y células de soporte.

Se ha descubierto en el suero de pacientes afectados de síndrome de Cogan la existencia de un antígeno peptídico que se expresa en las células de soporte⁸⁷. Asimismo los anticuerpos contra el péptido de Cogan se expresan en las células de soporte del oído interno, y son capaces de reconocer péptidos sintéticos con una secuencia similar a la de la conexina 26. Los pacientes con sospecha de enfermedad inmunomediada del oído interno poseen anticuerpos contra proteínas de 68-72 KDa y

contra las células de soporte similares al anticuerpo KHRI-3. Estos anticuerpos reconocen extractos de cóclea de cobaya identificando proteínas de 68-70 KDa lo cual sugiere que el anticuerpo monoclonal anti KHRI-3 y los anticuerpos humanos reconocen el mismo antígeno en las células de soporte del oído interno (Proteína 2 de la proteína similar al transportador de colina)⁸⁸.

Además existen receptores de glucocorticoides en los fibrocitos tipo III del ligamento espiral, y en las células de soporte pero no en las CCE⁸⁹. Es decir, que la diana terapéutica de los esteroides en el oído interno no serían las CCE sino las células de soporte y los fibrocitos de la pared lateral.

1.3.4. Células de soporte y ototoxicidad inducida por CDDP.

Cuando se realizan tests de audición a los animales tratados con dosis bajas de CDDP a largo plazo se puede evidenciar un incremento de la pérdida auditiva incluso hasta 120 días después de la inyección de CDDP, lo cual contradice la creencia de que el daño en las CCE ocurre en un corto periodo de tiempo tras la administración de CDDP tal como se creía previamente. La existencia de daño a medio y largo plazo sugiere la existencia de una estructura intermediaria que controla el funcionamiento de las CCE y las CCI, y que posee una influencia sobre la cronología del daño del epitelio sensorial. La acumulación de CDDP es mucho mayor en la cóclea que en el cerebro y mediante electroforesis se ha demostrado que en el tejido coclear existe gran cantidad de CDDP unido a proteínas de peso molecular muy similar a las proteínas específicas del órgano de Corti OCP 1, OCP2 y oncomodulina. Éstas están presentes de manera casi exclusiva en las células de soporte lo que sugiere que las células de soporte juegan un papel fundamental en la ototoxicidad por CDDP.

El análisis por microscopía óptica demuestra los siguientes estadios evolutivos en la ototoxicidad por CDDP⁹⁰. Primero, aumento de volumen de las células de Hensen y protusión de las células de Deiters en el espacio de Nuel; segundo, degeneración gradual de las CCE con vacuolización de la zona basal de las CCI; y tercero, colapso de la membrana de Reissner y del órgano de Corti con daño variable de las CCI.

Marco-Algarra²² ha sugerido que la lesión de las CCI podría ser el resultado de una alteración de la producción energética y de la síntesis proteica en el retículo endolinfático. Los cambios funcionales se asocian con la aparición precoz de fenómenos apoptóticos en la superficie cuticular de las células de Deiters con aparente integridad de las CCE que posteriormente comienzan a mostrar cambios degenerativos en los estereocilios de los animales con mayor supervivencia.

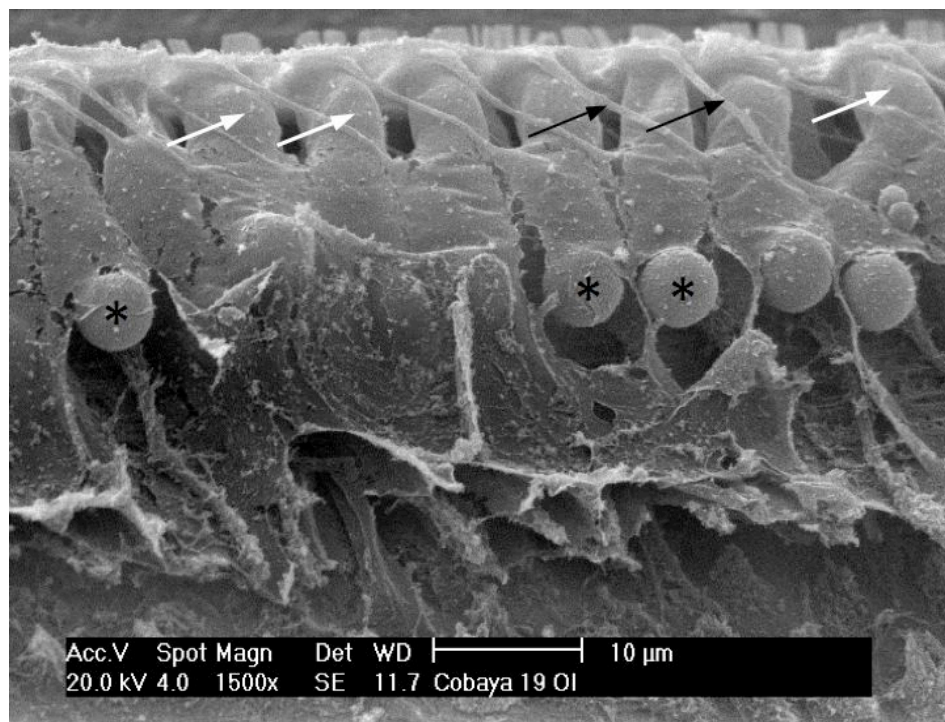


FIGURA 28. IMAGEN DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DEL OÍDO INTERNO DE COBAYA TRATADA CON CDDP EN LA QUE SE APRECIAN LAS CÉLULAS DE SOPORTE (*) EN ÍNTIMA RELACIÓN CON LAS CÉLULAS SENSORIALES (FLECHA BLANCA), ASÍ COMO LAS PROLONGACIONES CITOPASMÁTICAS DE LAS CÉLULAS DE DEITERS (FLECHA NEGRA). MAGNIFICACIÓN 1500X.

El estudio de Ramírez-Camacho *et al*⁹¹ demuestra que el CDDP afecta en primer lugar a las células de Deiters y Hensen mientras que las CCE y las CCI, comienzan posteriormente a experimentar lesiones estructurales y funcionales cuando se deteriora de manera importante el sistema de mantenimiento de las funciones fisiológicas en el órgano de Corti. Esto justificaría la pérdida auditiva a largo plazo en animales con mayores supervivencias tras la inyección de CDDP. Algunos trabajos han demostrado la selectividad del efecto del CDDP sobre las CCE y la estría vascular con preservación de las células de soporte. Sin embargo, en este estudio⁹¹ se demuestra mediante microscopía electrónica de

barrido la tendencia a la degeneración del citoplasma de las células de soporte con preservación de la integridad nuclear previa a la destrucción de las CCE. (Figuras 28 y 29).

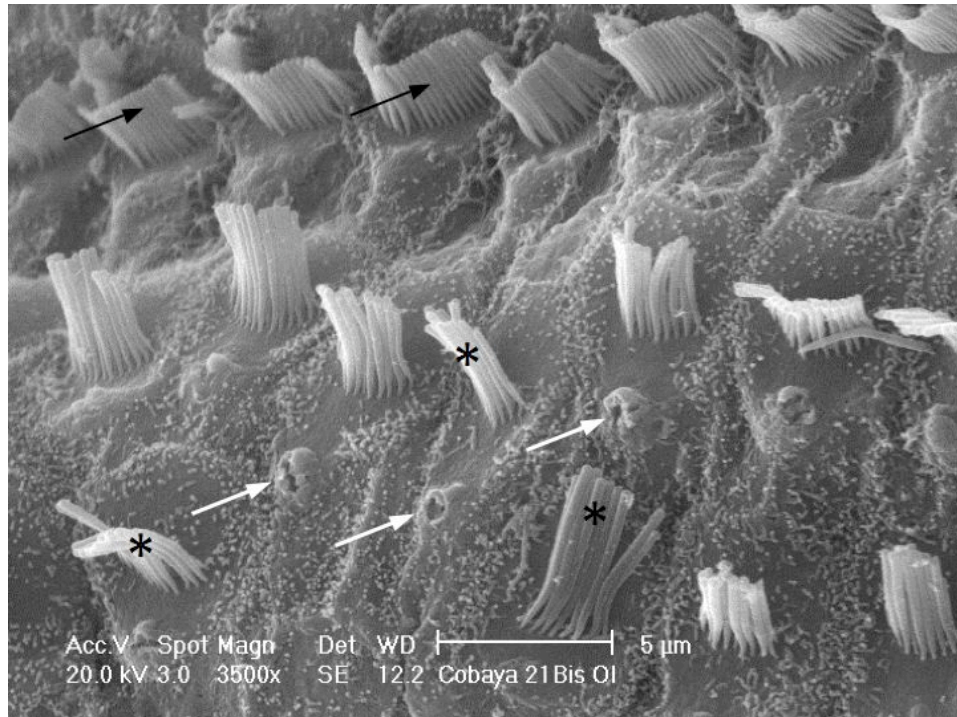


FIGURA 29. IMAGEN DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DEL OÍDO INTERNO DE COBAYA TRATADO CON CDDP EN LA QUE SE APRECIAN LAS PROLONGACIONES CILIARES DE LAS CCE SANAS (FLECHA NEGRA), LA APARICIÓN DE POROS DE MEMBRANA EN LA SUPERFICIE CUTICULAR DE LAS CCE (FLECHA BLANCA) Y PROLONGACIONES CILIARES ALTERADAS (*). MAGNIFICACIÓN 3500x.

1.3.5. Células de soporte y regeneración del epitelio sensorial.

Se acepta universalmente que la pérdida de células postmitóticas como las CCE y las CCI del órgano de Corti provoca una pérdida irreversible de la función sin posibilidad de regeneración espontánea en mamíferos. Sin embargo en el órgano de Corti de las aves, las células de soporte son capaces de regenerar el epitelio sensorial dañado incluso en la edad adulta. El reciente hallazgo de la expresión del gen 27 Kip-1, exclusivo de las células de soporte, implicado en el mantenimiento celular en un estado diferenciado terminal, hace pensar que la alteración de la expresión de este gen puede proveer una regeneración celular⁹². También, la existencia de células madre embrionarias y diferenciadas

en la cóclea de rata recién nacida hace pensar en la posibilidad de una regeneración de las células sensoriales del oído interno en mamíferos⁹³.

2. El CDDP como inductor de la apoptosis celular en el oído interno.

Modelo experimental de ototoxicidad inducida por CDDP y caracterización de la apoptosis inducida por CDDP en la cóclea de rata SD.

Trabajo 2. The anticancer drug cisplatin induces an intrinsic apoptotic pathway inside the inner ear. British Journal of Pharmacology 2007;152:1012-20.

2.1. Materiales y métodos:

Se usaron 36 ratas SD para la medición y caracterización de los fenómenos relacionados con la actividad apoptótica tras la inyección de CDDP. (Figura 30). En todos los animales se realizó estudio electrofisiológico de la audición en estado basal y en las horas previas a la eutanización.

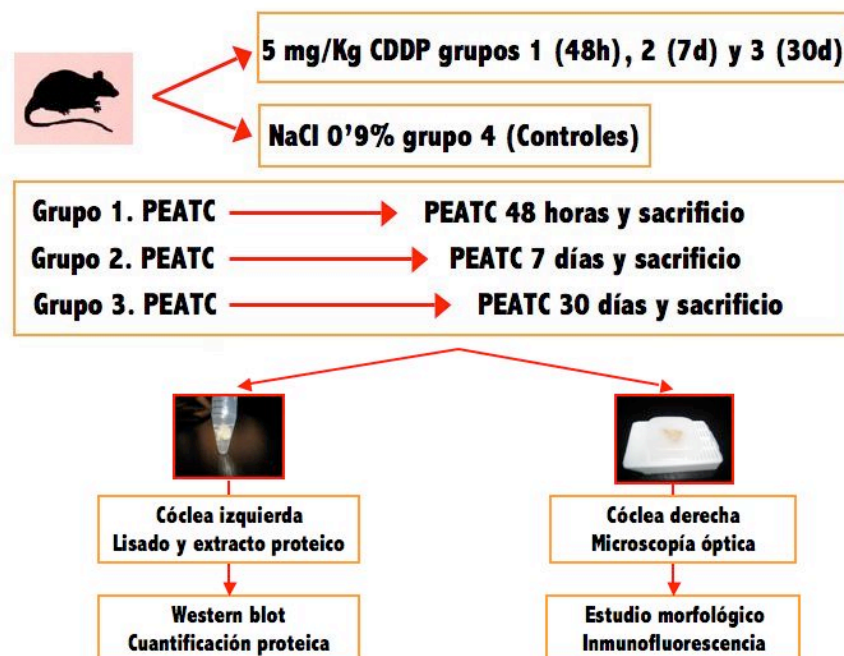


FIGURA 30. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL TRABAJO 2. CDDP: CISPLATINO. NaCl: SOLUCIÓN FISIOLÓGICA. PEATC: REALIZACIÓN DE POTENCIALES EVOCADOS AUDITIVOS DE TRONCO CEREBRAL. 48h: GRUPO SACRIFICADO A LAS 48 HORAS. 7d: GRUPO SACRIFICADO A LOS 7 DÍAS. 30d: GRUPO SACRIFICADO A LOS 30 DÍAS.

Grupo 1.- (n = 10) Animales sacrificados a las 48 horas de la inyección de 5 mg/Kg de CDDP.

Grupo 2.- (n = 10) Animales sacrificados a los 7 días de la inyección de 5 mg/Kg de CDDP. En este grupo se realizó un segundo ciclo de mediciones de la actividad apoptótica para relacionarlo con los hallazgos obtenidos en el estudio del papel de la HSP-70.

Grupo 3.- (n = 10) Animales sacrificados a los 30 días de la inyección de 5 mg/Kg de CDDP.

Grupo 4.- (n = 6) Animales control a los que se inyectó 1 ml de una solución de NaCl al 0'9% y que fueron sacrificados a las 48 horas (n=2), a los 7 días (n=2) y a los 30 días (n=2).

2.2. Resultados:

2.2.1 Cálculo de los umbrales de audición mediante PEATC.

Los umbrales auditivos se elevaron significativamente en los animales de todos los grupos tratados con CDDP. (Tabla 10). El umbral auditivo medio en el grupo sacrificado a las 48 horas se elevó de $21'5 \pm 7$ dB (Media \pm DE) a $30'5 \pm 5'9$. En el grupo de 7 días la prueba determinó un incremento de $26'2 \pm 6'7$ dB a $39'3 \pm 16'1$ dB. En el grupo de 30 días los PEA tuvieron un incremento de $27'2 \pm 8'5$ dB a $37'5 \pm 14$ dB. Sólo se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0'05$) en el grupo sacrificado a las 48 horas frente al control, no siendo significativos los resultados obtenidos al comparar este grupo con los sacrificados más tardíamente. En el grupo control no se demostraron cambios significativos.

	Grupo Control	Grupo CDDP 48 horas	Grupo CDDP 7 días	Grupo CDDP 30 días
Pretratamiento	21'4	21'5	26'2	27'2
Sacrificio	21'6	30'5	39'3	37'5
Significación estadística	$p > 0'05$	$p < 0'05$	$p > 0'05$	$p > 0'05$

TABLA 10. RESULTADOS DE LOS UMBRALES DE LOS POTENCIALES EVOCADOS AUDITIVOS DEL GRUPO CONTROL FRENTE A LOS GRUPOS TRATADOS CON CISPLATINO (CDDP).

2.2.2. Caracterización de la apoptosis inducida por CDDP en la cóclea de rata SD.

2.2.2.1. Western blot y contenido proteico.

Con el objetivo de determinar la presencia de factores inductores precoces de muerte celular programada se monitorizaron las actividades de las caspasas 3/7 en el extracto proteico de cóclea de rata SD en diferentes momentos tras la inyección de CDDP. Los resultados muestran un notable incremento de la actividad de las caspasas 3/7 en el extracto de cóclea de rata SD tras la administración de CDDP (figura 31). Así las ratas SD del grupo sacrificado a las 48 horas mostraron una actividad de 229638 ± 8439 unidades relativas de luminiscencia (RLU) frente al grupo control 104964 ± 12995 RLUs ($p < 0.001$). Los animales del grupo de 7 días mostraron una actividad de 248921 ± 9314 RLUs ($p < 0.001$ frente grupo control). Sin embargo, las ratas SD del grupo de 30 días mostraron una disminución de la actividad de las caspasas 3/7, 162733 ± 4396 , aunque la diferencia seguía siendo todavía significativa frente al grupo control ($p < 0.001$).

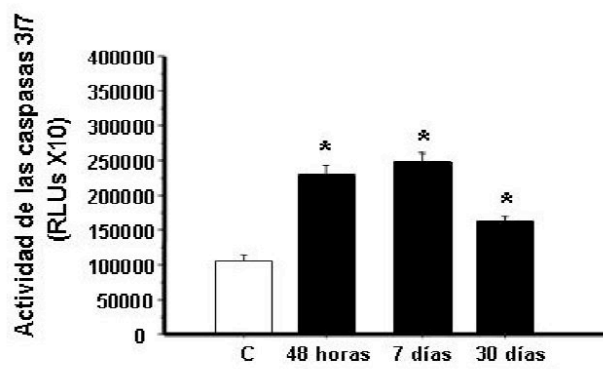


FIGURA 31. ACTIVIDAD DE LAS CASPASAS 3/7 EN EXTRACTOS PROTEICOS TOTALES DE CÓCLEA DE RATAS SD SACRIFICADAS A LAS 48 HORAS, LOS 7 DÍAS Y LOS 30 DÍAS DE LA INYECCIÓN DE CDDP. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN UNIDADES RELATIVAS DE LUMINISCENCIA (RLU). * $p < 0.05$ FRENTE AL GRUPO CONTROL. C: GRUPO CONTROL.

Se analiza la expresión de la forma activa p-20 de la proteína caspasa 3 mediante análisis de Western-Blot. La representación de los resultados (figura 32) muestra una aumentada expresión de la proteína activa de la caspasa 3 en el grupo de animales tratados con CDDP. El análisis densitométrico de al menos cuatro experimentos independientes confirma que el CDDP aumenta la expresión de la caspasa 3 en la cóclea de rata SD. A las 48 horas del tratamiento, las cócleas mostraban $1.138.385 \pm 145.529$ unidades arbitrarias (UA), $1.501.223 \pm 128.844$ a los 7 días frente a las 744.320 ± 90.885 presentadas por el grupo control; ($p=0.04$ y $p<0.0001$, respectivamente). El último grupo, sacrificado a los 30 días de la inyección de CDDP, también mostró un incremento en la expresión de la proteína caspasa 3, aunque la diferencia no era estadísticamente significativa, $1.027.925 \pm 108.808$; ($p=0.124$).

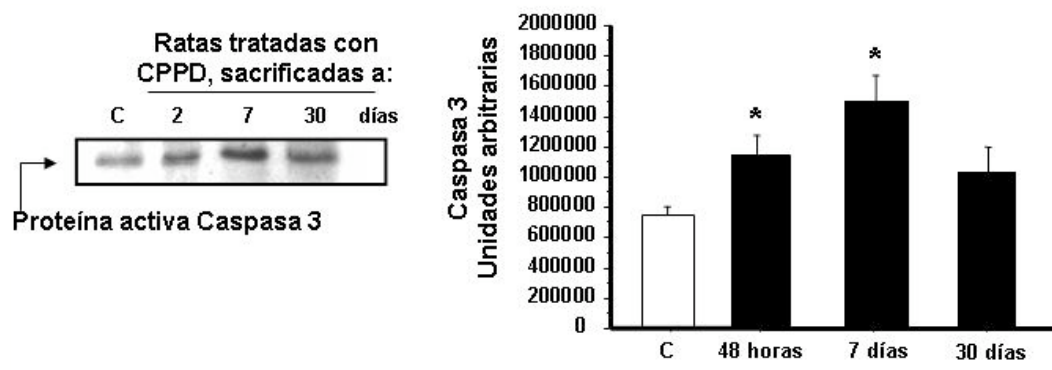


FIGURA 32. A LA IZQUIERDA WESTERN-BLOT REPRESENTATIVO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P-17, FORMA ACTIVA DE LA CASPASA-3 EN LOS EXTRACTOS PROTEICOS COCLEARES DE RATAS SD SACRIFICADAS A LAS 48 HORAS, LOS 7 DÍAS Y LOS 30 DÍAS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CDDP. A LA DERECHA SE MUESTRA EL ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LOS WESTERN-BLOT PREVIOS. RESULTADOS EXPRESADOS EN UNIDADES RELATIVAS DE LUMINISCENCIA. * $p<0.05$ FRENTE AL GRUPO CONTROL.

2.2.2.2. Tinción por inmunofluorescencia de la Caspasa-3

Hemos seleccionado las secciones cocleares de los animales sacrificados a los 7 días de la administración intraperitoneal de CDDP ya que en esta fecha presentaban los niveles más altos de actividad de la enzima caspasa 3 en los extractos proteicos completos de cóclea de rata SD según se observa en la figura 31. Los resultados muestran el aumento de la actividad de la caspasa 3 en diferentes poblaciones celulares del órgano de Corti como las células interdentes del limbo espiral, las

células del *sulcus* interno, las CCE y CCI y las células de Hensen. Del mismo modo la membrana de Reissner y las células marginales de la estría vascular también presentan un importante aumento de la actividad de la caspasa 3 en comparación a los animales del grupo control. (Figura 33).

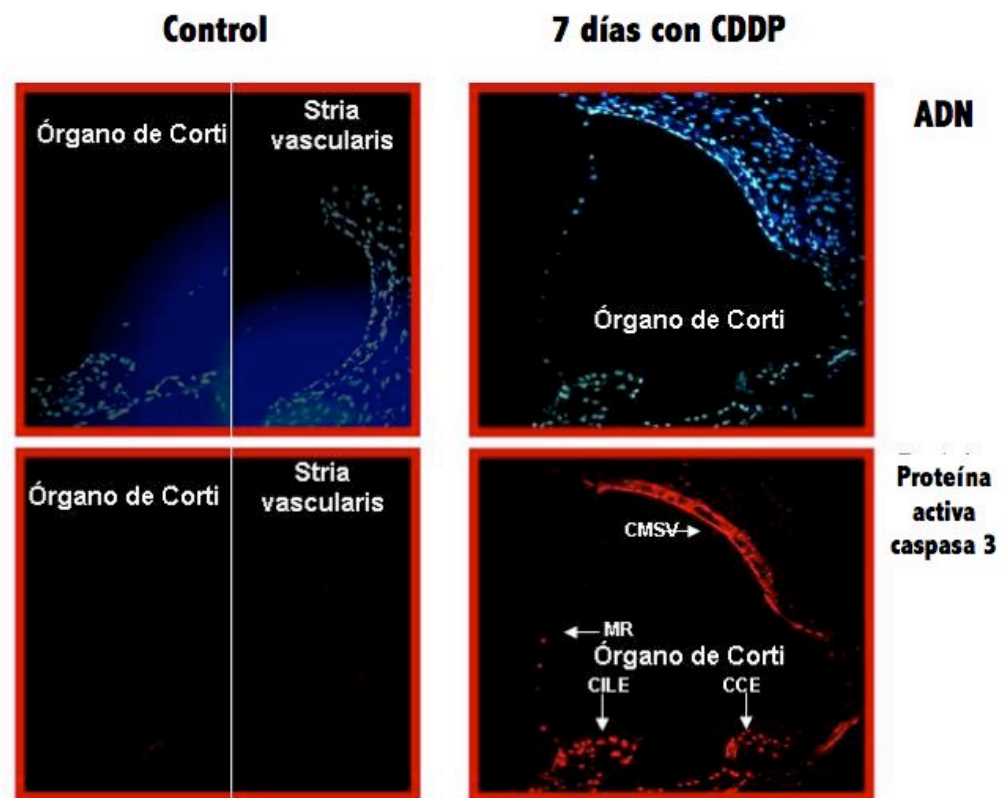


FIGURA 33. EN LA PARTE INFERIOR DERECHA DE LA IMAGEN SE PUEDE VER LA INMUNOFIJACIÓN DE LA CASPASA-3 ACTIVA EN EL ÓRGANO DE CORTI DE RATAS SD TRAS 7 DÍAS DE LA INYECCIÓN DE UNA DOSIS ÚNICA DE CISPLATINO (5MG/KG). UN AUMENTO DE LA INMUNOTINCIÓN PUEDE DISTINGUIRSE EN DIVERSAS POBLACIONES CELULARES. CMSV: CÉLULAS MARGINALES DE LA ESTRÍA VASCULAR. MR: MEMBRANA DE REISSNER. CCE: CÉLULAS CILIADAS EXTERNAS. CILE: CÉLULAS INTERDENTALES DEL LIMBO ESPIRAL. EN LA PARTE SUPERIOR TINCIÓN DE ADN SIMILAR EN ANIMALES TRATADOS Y CONTROL. MAGNIFICACIÓN 400X.

2.2.2.3. Medida de la actividad de las diferentes caspasas para la determinación de la vía apoptótica predominante

Para distinguir la actividad apoptótica mediada por la actividad intrínseca o extrínseca de la cascada de las caspasas activada por el tratamiento con CDDP en la cóclea de rata SD se cuantificó la actividad de la caspasa-8 y de la caspasa-9 como efectoras iniciales mediante determinación específica de

su inmunofluorescencia. Sólo se observó un descenso de la actividad dependiente del tiempo en la actividad de la caspasa-8 a los 7 días del tratamiento con CDDP (712.846 ± 13.401 URL para el grupo control frente a 403.518 ± 1.930 , ($p < 0.0001$). Por otra parte el grupo sacrificado a los 30 días de la inyección de CDDP presentaba unos niveles de actividad de la caspasa 8 ligeramente superiores a los del grupo control. (750.018 ± 34.203 URL). (Figura 34).

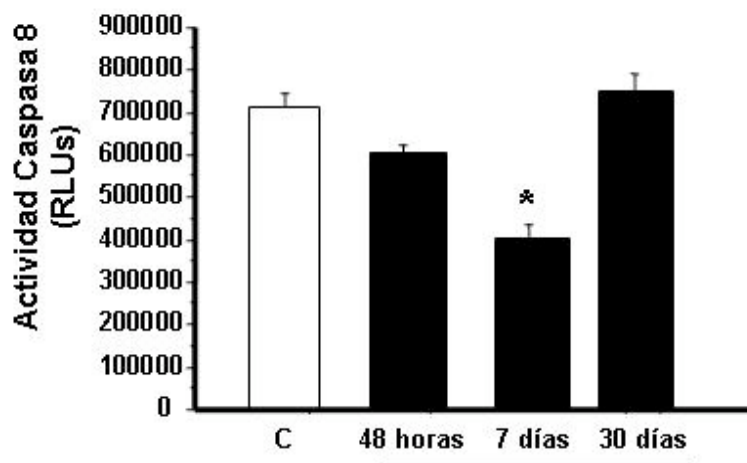


FIGURA 34. ACTIVIDAD DE LA CASPASA-8 EN EXTRACTO COMPLETO DE CÓCLEA DE RATA SD SACRIFICADAS A LAS 48 HORAS, LOS 7 DÍAS Y LOS 30 DÍAS FRENTE AL GRUPO CONTROL. RESULTADOS EXPRESADOS EN UNIDADES RELATIVAS DE LUMINISCENCIA (RLU). * $p < 0.05$ FRENTE AL GRUPO CONTROL.

La actividad de la caspasa-9 fue claramente incrementada por la administración de CDDP intraperitoneal. Se apreció una aumentada luminiscencia en las ratas del grupo sacrificado a los 7 días, 184.352 ± 13.479 URL para el grupo control frente a 556.302 ± 22.178 para el grupo de 7 días, ($p = 0.0012$) algo menor para las del grupo sacrificado a las 48 horas, (413.625 ± 26.280 URL) con un ligero descenso de la actividad en el grupo sacrificado a los 30 días. (337.185 ± 104.858 URL). (Figura 35).

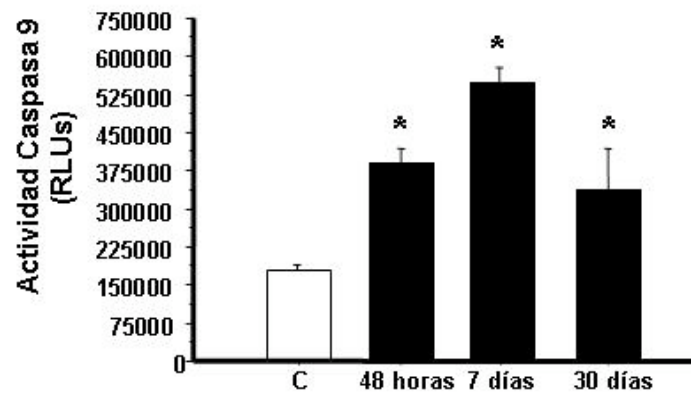


FIGURA 35. ACTIVIDAD DE LA CASPASA-9 EN EXTRACTO COMPLETO DE CÓCLEA DE RATAS SD SACRIFICADAS A LAS 48 HORAS, LOS 7 DÍAS Y LOS 30 DÍAS FRENTE AL GRUPO CONTROL (C). RESULTADOS EXPRESADOS EN UNIDADES RELATIVAS DE LUMINISCENCIA (RLU). * $p < 0.05$ FRENTE AL GRUPO CONTROL.

Para apoyar la intervención de la cascada apoptótica intrínseca en la muerte celular mediada por CDDP se comprobó la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bax mediante Western-Blot. La proteína Bcl-2 es miembro de la familia de las proteínas derivadas del gen Bcl-2, que normalmente inhiben el proceso de muerte celular bloqueando la unión de la caspasa-9 al factor activador de proteínas apoptóticas-1 (Apaf-1). La expresión de la proteína Bcl-2 es más alta en los extractos proteicos de las ratas SD del grupo control (392.434 ± 22.963 UA) que en los extractos del grupo de 48 horas, (295.170 ± 27.526 UA, $p \leq 0.05$) y del grupo de 7 días, (257.060 ± 60.702 UA, $p \leq 0.05$) aunque levemente inferior que en el grupo de 30 días. (407.111 ± 39.723 UA, $p \leq 0.758$). (Figura 36).

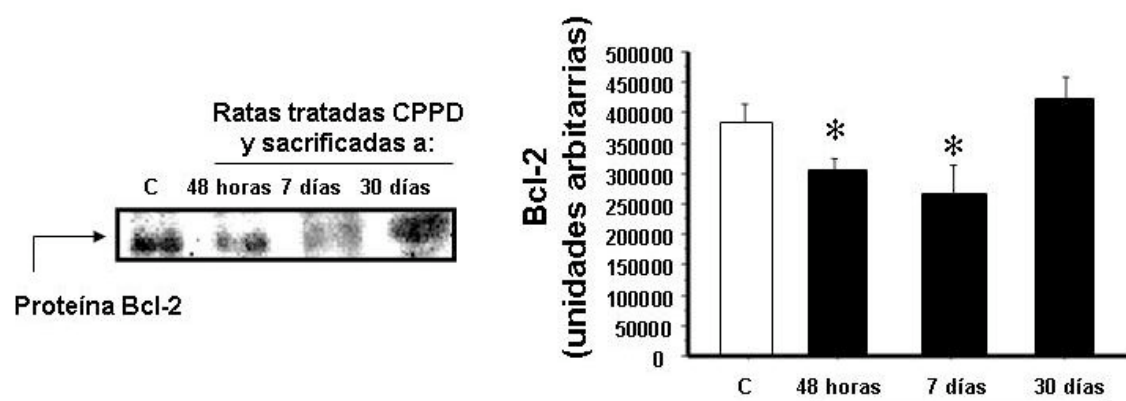


FIGURA 36. A LA IZQUIERDA WESTERN-BLOT REPRESENTATIVO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA BCL-2 ANTIAPOPTÓTICA EN EXTRACTOS COMPLETOS DE CÓCLEA DE RATAS SD SACRIFICADAS A LAS 48 HORAS, A LOS 7 DÍAS Y A LOS 30 DÍAS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CDDP. EL ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LOS WESTERN-BLOT PREVIOS SE MUESTRA A LA DERECHA. * $p < 0.05$ FRENTE AL GRUPO CONTROL.

En contraposición, la expresión de la proteína Bax (proteína proapoptótica) se vio claramente incrementada por la administración de CDDP 39.427 ± 5.788 UA para el grupo control frente a 54.336 ± 6.968 ; $p=0.16$ para el grupo sacrificado a las 48 horas ó 64.310 ± 9.321 , $p=0.026$ para el grupo sacrificado a los 7 días. El último grupo, sacrificado a los 30 días del tratamiento con CDDP también mostró diferencias no significativas con el grupo control, 28.673 ± 6.130 ; $p=0.305$ (Figura 37).

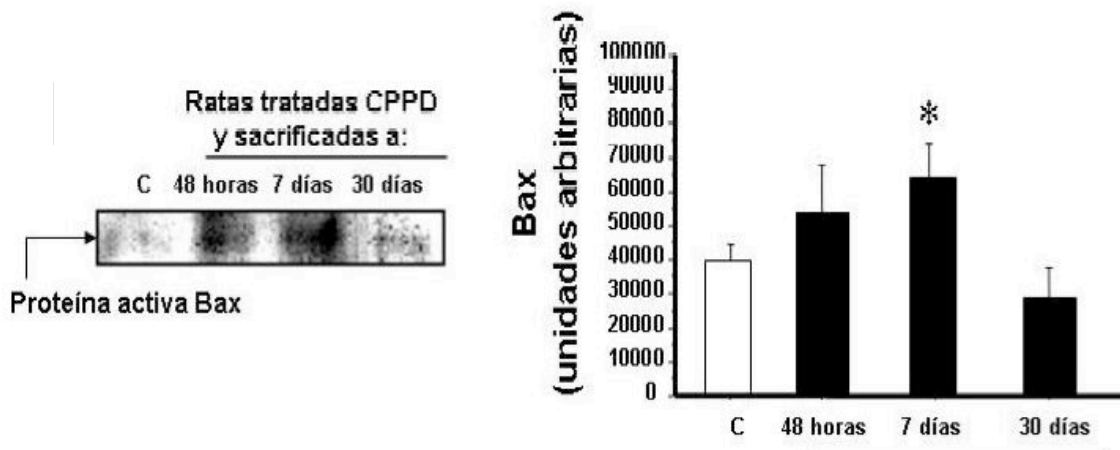


FIGURA 37. A LA IZQUIERDA WESTERN-BLOT REPRESENTATIVO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEINA BAX ACTIVA PROAPOPTÓICA EN EXTRACTOS COMPLETOS DE CÓCLEA DE RATAS SD SACRIFICADAS A LAS 48 HORAS, A LOS 7 DÍAS Y A LOS 30 DÍAS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CDDP. EL ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LOS WESTERN-BLOT PREVIOS SE MUESTRA A LA DERECHA.

* $p<0.05$ FRENTE AL GRUPO CONTROL.

2.2.2.4. Cuantificación de los niveles de Adenosín-trifosfato.

Los datos procedentes de la cuantificación de los niveles de ATP presentes en los extractos de cóclea de rata SD parecen mostrarse como un indicador de la actividad metabólica celular. Así, los niveles de ATP claramente disminuyeron con el tiempo. 31.549 ± 1.243 en el grupo sacrificado a las 48 horas, y 27.406 ± 695 en el grupo de 7 días frente a 54.100 ± 4413 en el grupo control; $p<0.001$. Sólo en el grupo de 30 días hubo un aumento de los niveles de ATP, 47.114 ± 1.456 . (Figura 38).

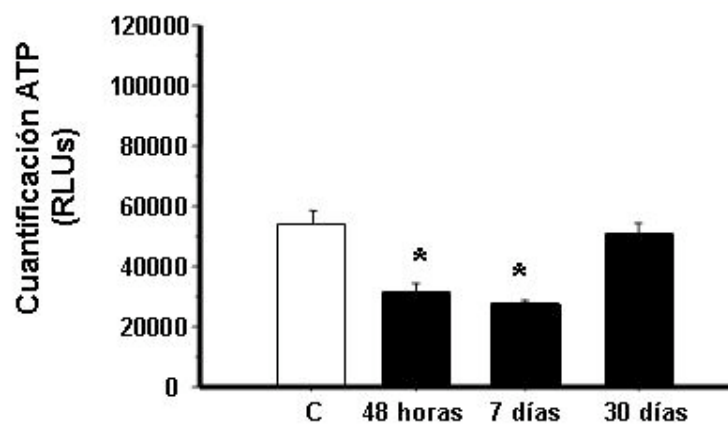


FIGURA 38. NIVELES DE ADENOSÍN TRIFOSFATO (ATP) EN EXTRACTOS PROTEICOS TOTALES DE CÓCLEA DE RATAS SD SACRIFICADAS A LAS 48 HORAS, LOS 7 DÍAS Y LOS 30 DÍAS DE LA INYECCIÓN DE CDDP. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN UNIDADES RELATIVAS DE LUMINISCENCIA (RLU). * $p < 0.05$ FRENTE AL GRUPO CONTROL. C: GRUPO CONTROL.

2.2.2.5. Cambios en los niveles de actividad total de la SOD.

Se demostró un significativo aumento de la actividad de la enzima antioxidante SOD en el extracto completo de cóclea (de 0.030 ± 0.026 U/ml para los animales del grupo control frente a 0.061 ± 0.004 U/ml para el grupo sacrificado a las 48 h, $p=0.0021$; frente a 0.13 ± 0.001 U/ml para el grupo de 7 días, $p \leq 0.0001$ y frente a 0.098 ± 0.006 U/ml para el grupo de los 30 días, $p \leq 0.0001$). (Figura 39). En la actividad de la enzima SOD las diferencias entre los grupos tratados con CDDP fueron estadísticamente significativas (para el grupo de 48 horas frente al grupo de 7 días o el grupo de 30 días; $p \leq 0.0001$ y $p=0.0002$ respectivamente; o del grupo de 7 días frente al grupo de 30 días; $p=0.04$).

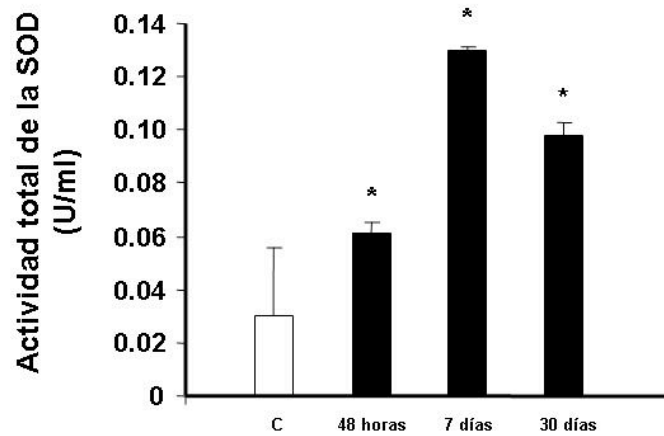


FIGURA 39. EL TRATAMIENTO CON CDDP REGULA LA ACTIVIDAD TOTAL DE SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) EN LA CÓCLEA DE RATA SD. SE PRESENTA LA ACTIVIDAD TOTAL DE LA SOD EN EXTRACTOS TOTALES DE CÓCLEA DE RATA SD A LAS 48 HORAS, A LOS 7 DÍAS Y A LOS 30 DÍAS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CDDP. LOS RESULTADOS ESTÁN EXPRESADOS EN UNIDADES/ML. UNA UNIDAD DE ACTIVIDAD SE DEFINE COMO LA CANTIDAD DE ENZIMA NECESARIA PARA EL PROCESAMIENTO DEL 50 % DEL RADICAL SUPERÓXIDO. * $p < 0.05$ FRENTE AL GRUPO CONTROL.

3. Inhibición de la apoptosis inducida por CDDP en el oído interno.

Modelo experimental de inhibición de la apoptosis celular inducida por CDDP en el oído interno.

Trabajo 3. Modelo experimental de inhibición de la apoptosis celular en la cóclea de rata SD mediante inhibidores específicos de la actividad de las caspasas de la vía intrínseca y de las caspasas efectoras.

3.1. Material y métodos:

Caracterización de la actividad apoptótica inducida por CDDP a los 7 días de exposición tras inhibición de la actividad de las caspasas (n=16). (Figura 40).

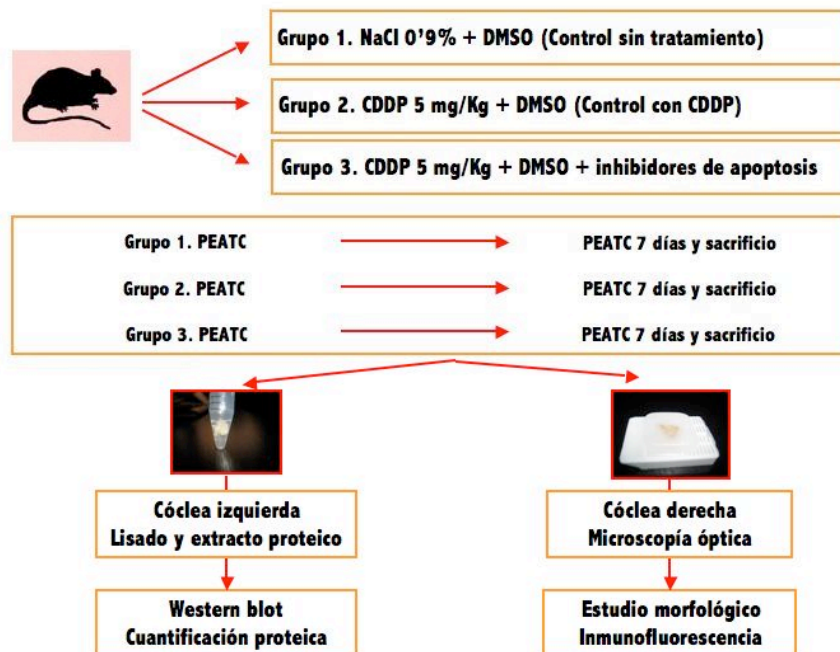


FIGURA 40. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL TRABAJO 3. NaCl: SOLUCIÓN FISIOLÓGICA. CDDP: CISPLATINO. DMSO: DIMETILSULFÓXIDO. PEATC: REALIZACIÓN DE POTENCIALES AUDITIVOS DE TRONCO CEREBRAL.

Grupo 1.- (n = 5) Animales control a los que se inyectó 1 ml de una solución de NaCl al 0'9% más tres dosis de DMSO en los días -1, 0, y +1 de la inyección intraperitoneal de NaCl al 0'9%, necesaria en los grupos que recibieron inhibidores de la apoptosis para la dilución del inhibidor y con potencial efecto tóxico a nivel celular. Estos animales fueron sacrificados a los 7 días de la inyección de NaCl al 0'9%.

Grupo 2.- (n = 5) Animales sacrificados a los 7 días de la inyección de CDDP más tres dosis de DMSO en los días -1, 0, y +1 de la inyección intraperitoneal de CDDP.

Grupo 3.- (n = 6) Animales sacrificados a los 7 días de la inyección de CDDP más tres dosis de 5mg/Kg de inhibidores irreversibles de las caspasas-3/-7 (Z-DEVD-FMK) y de la caspasa-9 (Z-LEHD-FMK) diluidos en DMSO en los días -1, 0, y +1 de la inyección intraperitoneal de CDDP.

3.2. Resultados:

3.2.1. Cálculo de los umbrales de audición mediante PEATC.

Los umbrales auditivos se elevaron significativamente a los 7 días en los animales del grupo tratado con CDDP y sin inhibidores de la actividad de las caspasas. (Tabla 11).

	Grupo Control	Grupo CDDP + DMSO	Grupo CDDP + DMSO + INHIBIDORES
Pretratamiento	17 ± 6'74	16 ± 4'59	15 ± 6'74
Sacrificio	18 ± 10'32	32 ± 16'86	18'33 ± 10'94
Significación estadística	0'4	0'013	0'75

TABLA 11. RESULTADOS DE LOS POTENCIALES EVOCADOS AUDITIVOS EN ANIMALES CONTROL, TRATADOS CON CISPLATINO Y CON PROTECCIÓN ANTIAPOPTÓTICA CON INHIBIDORES DE CASPASAS. RESULTADOS EN MEDIA ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR. NÓTESE LA SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA ÚNICAMENTE EN EL GRUPO TRATADO CON CISPLATINO Y SIN PROTECCIÓN ANTIAPOPTÓTICA INDICANDO UN MANTENIMIENTO DE LA CAPACIDAD AUDITIVA EN 8 KHZ EN E GRUPO TRATADO CON CISPLATINO Y CON INHIBIDORES DE CASPASAS.

Tanto en el grupo control como en el grupo de animales a los que se administraron inhibidores de caspasas no se demostraron cambios significativos en el umbral auditivo a 8 KHz. Para el umbral auditivo medio en el grupo tratado con CDDP la prueba determinó un incremento de 16 ± 4'59 dB a 32

$\pm 16'86$ dB. En el grupo de CDDP con inhibidores de caspasas los PEATC pasaron de $15 \pm 6'74$ dB a $18'33 \pm 10'94$ dB. En el grupo control los PEATC pasaron de $17 \pm 6'74$ dB a $18 \pm 10'32$ dB.

3.2.2. Western blot y contenido proteico.

Se monitorizaron las actividades de las caspasas 3/7 como indicador de apoptosis en el extracto proteico de cóclea de rata SD en los animales con los dos tratamientos y en el grupo control. Los resultados muestran una notable disminución de la actividad de las caspasas 3/7 en el extracto de cóclea de rata SD tras la administración de CDDP cuando se asoció la administración de inhibidores de caspasas (figura 41). Así las ratas SD del grupo con CDDP y sin inhibidores mostraron una actividad de $1.874.595 \pm 286.545,39$ RLUs frente al grupo control $62.855 \pm 7.151,08$ RLUs ($p < 0'001$). Los animales del grupo tratado con CDDP más inhibidores de caspasas mostraron una actividad de $566.292 \pm 140.067,15$ RLUs ($p < 0'05$ frente al grupo sin inhibidores).

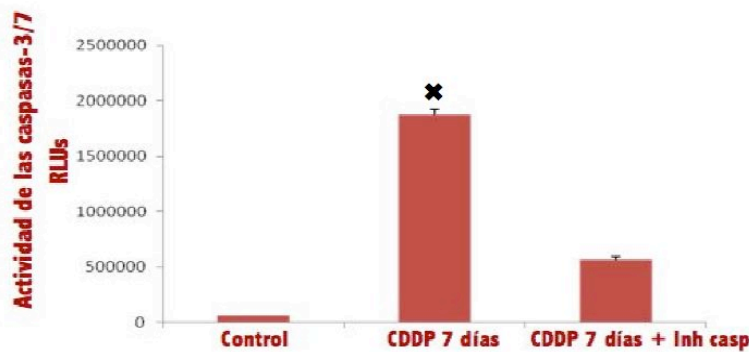


FIGURA 41. ACTIVIDAD DE LAS CASPASAS-3/7 EN EXTRACTOS PROTEICOS TOTALES DE CÓCLEA DE RATAS SD SACRIFICADAS A LOS 7 DÍAS DE LA INYECCIÓN DE SUERO FISIOLÓGICO (CONTROL), DE CDDP (CDDP 7 DÍAS) Y DE CDDP MÁS INHIBIDORES DE CASPASAS (CDDP 7 DÍAS + INH CASP). *: $p < 0'05$. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN UNIDADES RELATIVAS DE LUMINISCENCIA (RLUs).

La actividad de la caspasa-9 fue claramente incrementada por la administración de CDDP intraperitoneal. Se apreció una aumentada luminiscencia ($p < 0'05$) tanto en el grupo con inhibidores a los 7 días, ($6.702.383 \pm 37.735$ URL), como en el grupo que recibió CDDP sin inhibidores, ($4.318.486 \pm 65.209$ URL). El grupo control mostró una luminiscencia de $1.792.009 \pm 17.886$. (Figura 42).

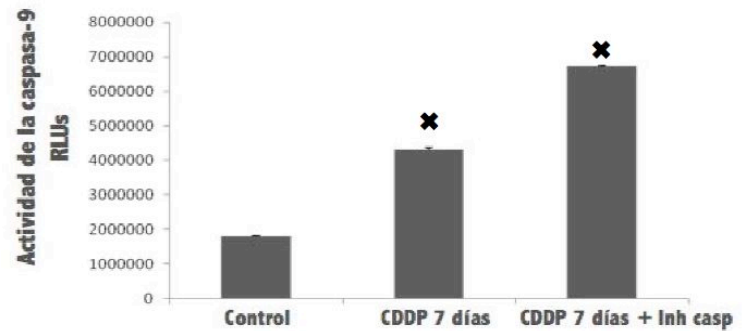


FIGURA 42. ACTIVIDAD DE LA CASPASA-9 EN EXTRACTO COMPLETO DE CÓCLEA DE RATA SD SACRIFICADAS A LOS 7 DÍAS DE LA INYECCIÓN DE CDDP (CDDP 7 DÍAS) O DE LA INYECCIÓN DE CDDP CON INHIBIDORES DE CASPASAS (CDDP 7 DÍAS + INH CASP) FRENTE AL GRUPO CONTROL. *: $p < 0.05$. RESULTADOS EXPRESADOS EN UNIDADES RELATIVAS DE LUMINISCENCIA (RLUs).

3.2.3. Cuantificación de los niveles de Adenosín-trifosfato.

Los datos procedentes de la cuantificación de los niveles de ATP presentes en los extractos de cóclea de rata SD, indicadores de la actividad metabólica celular se muestran en la figura 43.

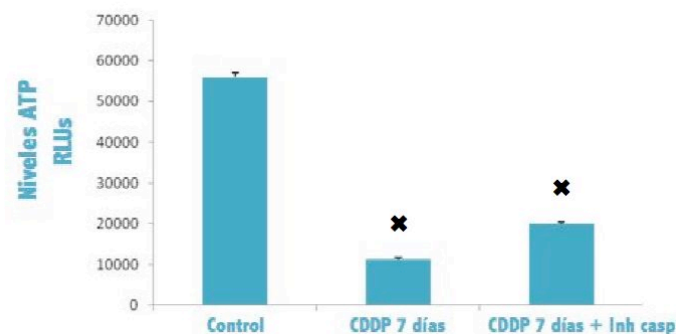


FIGURA 43. NIVELES DE ADENOSÍN TRIFOSFATO (ATP) EN EXTRACTOS PROTEICOS TOTALES DE CÓCLEA DE RATAS SD SACRIFICADAS A LOS 7 DÍAS DE LA INYECCIÓN DE CDDP (CDDP 7 DÍAS) O DE CDDP MÁS INHIBIDORES DE LA APOPTOSIS (CDDP 7 DÍAS + INH CASP). *: $p < 0.05$. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN UNIDADES RELATIVAS DE LUMINISCENCIA (RLU).

Así, los niveles de ATP disminuyeron en los grupos tratados con CDDP ($p < 0.05$). 11.275 ± 446 RLU en el grupo sacrificado a los 7 días de la inyección de CDDP frente a 56.014 ± 1.128 en el grupo control. En el grupo sacrificado a los 7 días de la inyección de CDDP con inhibidores de la actividad

de las caspasas hubo un aumento de los niveles de ATP, 20.082 ± 326 RLU, sin diferencias significativas frente al grupo sin inhibidores.

3.2.4. Tinción por inmunofluorescencia de Caspasa-3

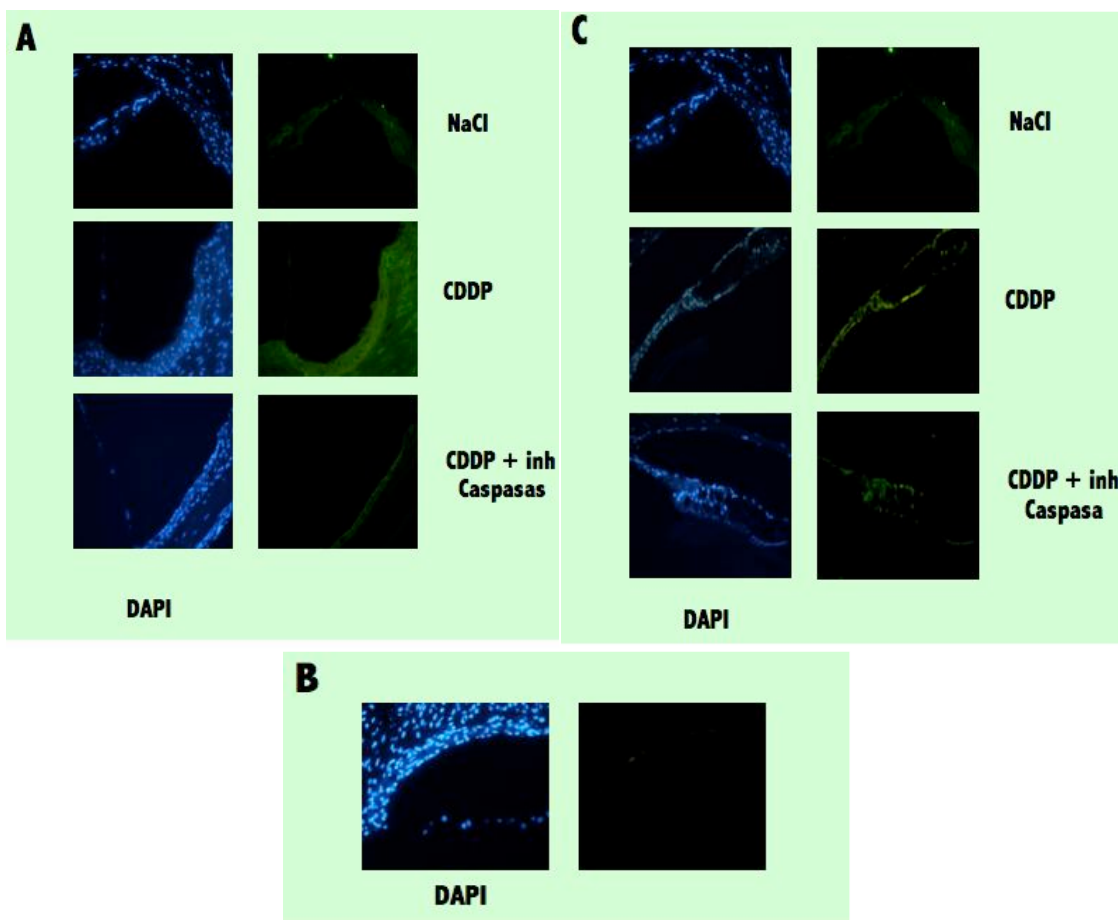


FIGURA 44. LAS IMÁGENES DE LA IZQUIERDA CON FLUORESCENCIA AZUL SON EL CONTROL DE ORIENTACIÓN CON DAPI. NaCl: GRUPO CONTROL. CDDP: GRUPO A LOS 7 DÍAS DE TRATAMIENTO CON CDDP. CDDP + inh Caspasas: INMUNOFUJACIÓN DE CASPASA-3 EN EL GRUPO CON INHIBIDORES DE CASPASAS. A: IMÁGENES DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN LA REGIÓN DE LA PARED LATERAL DEL ÓRGANO DE CORTI. NÓTESE LA IMPORTANTE DISMINUCIÓN DEL MARCAJE DE LA CASPASA-3 EN LA PARED LATERAL EN EL GRUPO CON INHIBIDORES. B: CONTROL NEGATIVO DE INMUNOFLUORESCENCIA. C: IMÁGENES DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN LA REGIÓN DEL ÓRGANO DE CORTI. NÓTESE LA IMPORTANTE DISMINUCIÓN DEL MARCAJE DE LA CASPASA-3 EN EL ÓRGANO DE CORTI EN EL GRUPO CON INHIBIDORES. MAGNIFICACIÓN 400X.

Los resultados sobre la pared lateral y el órgano de Corti muestran un marcado descenso de la actividad apoptótica en los grupos tratados con CDDP más inhibidores de caspasas frente al grupo tratado con CDDP. En el grupo con inhibidores se mantiene sobre la pared lateral una débil actividad en las células marginales de la estría vascular (Figura 44 A). En el órgano de Corti también se mantiene una débil tinción en la membrana basilar pero no en las diferentes poblaciones celulares del órgano de Corti. (Figura 44 C).

4. Búsqueda de marcadores precoces de ototoxicidad por CDDP.

La HSP-70 como marcador precoz de ototoxicidad por CDDP en la cóclea de rata Wistar.

Trabajo 4. HSP-70 as a nonspecific early marker in cisplatin ototoxicity. Acta Otolaryngologica 2007;127:564-7.

4.1. Material y métodos:

Estudio electrofisiológico de la audición y de la presencia de anticuerpos en suero de rata Wistar contra la HSP-70 de forma seriada en animales tratados con CDDP frente al grupo control para valorar la posibilidad de detección precoz de ototoxicidad (n=54). (Figura 45).

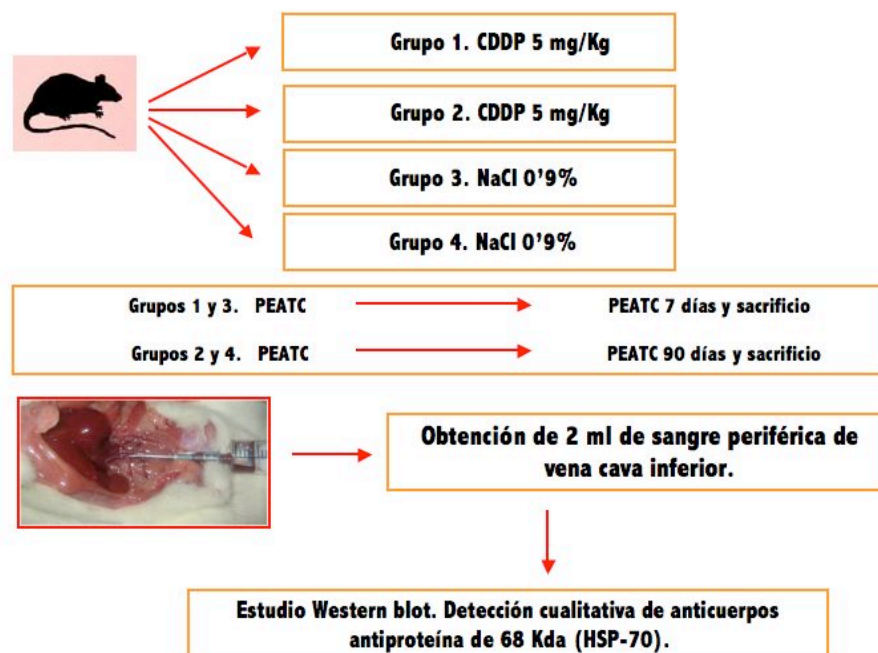


FIGURA 45. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL TRABAJO 4. NaCl: SOLUCIÓN FISIOLÓGICA. CDDP: CISPLATINO. PEATC: REALIZACIÓN DE POTENCIALES AUDITIVOS DE TRONCO CEREBRAL. HSP-70: PROTEÍNA DEL CHOQUE TÉRMICO-70.

Grupo 1.- 18 animales sacrificados a los 7 días de la inyección de 5 mg/Kg de CDDP.

Grupo 2.- 18 animales sacrificados a los 90 días de la inyección de 5 mg/Kg de CDDP.

Grupo 3.- 9 animales control sacrificados a los 7 días de la inyección de solución fisiológica.

Grupo 4.- 9 animales control sacrificados a los 90 días de la inyección de solución fisiológica.

4.2. Resultados:

4.2.1. Cálculo de los umbrales de audición mediante PEATC.

Los resultados del estudio electrofisiológico (Tabla 12) revelan una disminución de la capacidad auditiva en los grupos tratados con CDDP frente al grupo control de forma estadísticamente significativa.

Grupo	Media del umbral auditivo basal (dB)	Media del umbral previo al sacrificio (dB)
1. Supervivencia 7 días (n=18)	14'2	32'1 *
2. Supervivencia 90 días (n=18)	19'7	41'6 *
3 y 4. Controles (n=18)	15'3	15

TABLA 12. UMBRALES AUDITIVOS OBTENIDOS MEDIANTE POTENCIALES EVOCADOS AUTIVOS EN GRUPOS TRATADOS CON CDDP FRENTE A GRUPOS CONTROL. * $p < 0.05$

4.2.2. Presencia de anticuerpos antiHSP-70 mediante Western blot.

El análisis de Western-blot fue positivo en un 77'8% en el grupo sacrificado a los 7 días frente a un 44'4% en el grupo de 90 días ($p=0.040$). Sólo un 5'5% de los animales del grupo control presentaron anticuerpos antiHSP-70 en suero ($p < 0.01$ frente al grupo sacrificado a los 7 días). (Tabla 13).

Grupo	Western-blot cualitativo antiHSP-70 en sangre periférica	
	Positivo	Negativo
Grupos 1 y 2. Controles	5'5%	94'5%
Grupo 3. Sacrificados 7 días	77'8% * *	22'2%
Grupo 4 . Sacrificados 90 días	44'4%	55'6%

TABLA 13. RESULTADOS DEL WESTERN-BLOT CUALITATIVO. EN EL GRUPO SACRIFICADO A LOS 7 DÍAS SE ENCONTRARON DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS FRENTE AL GRUPO CONTROL (* $p < 0'01$) Y FRENTE AL GRUPO DE 90 DÍAS (* $p = 0'040$).

5. Mediadores de la actividad apoptótica inducida por CDDP.

La HSP-70 como mediador de la apoptosis inducida por CDDP en el oído interno de la rata SD.

Trabajo 5. Propiedades antiapoptóticas de la HSP-70 en la ototoxicidad inducida por CDDP. Relación de la inducción de la HSP-70 con los fenómenos apoptóticos y su localización dentro del oído interno.

5.1. Material y métodos:

Estudio de expresión de la HSP-70 a los 7 días de exposición al CDDP en tejido coclear y sangre periférica (n=44). (Figura 46).

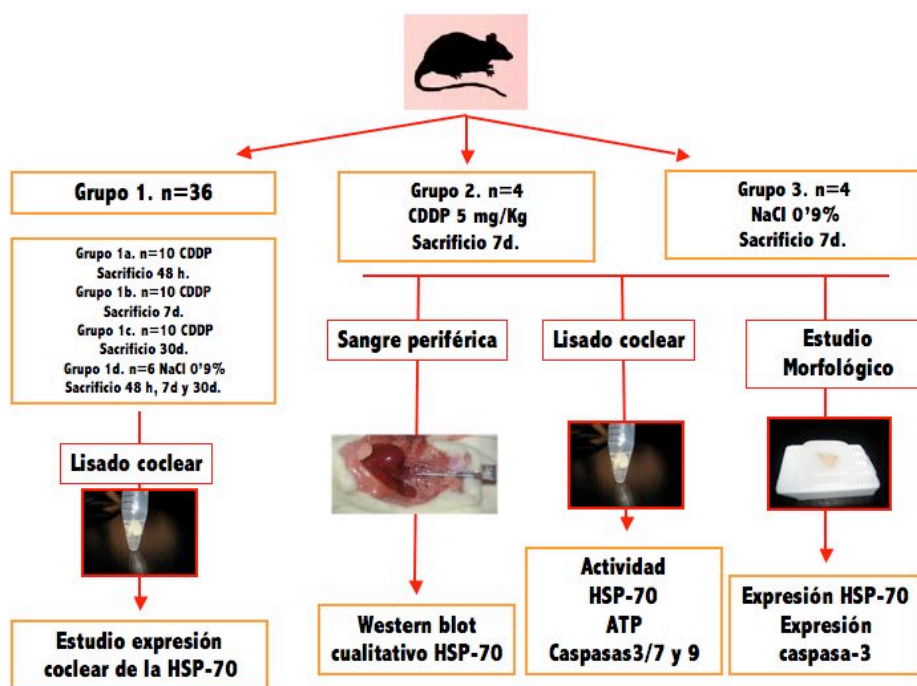


FIGURA 46. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL TRABAJO 5. n: NÚMERO DE ANIMALES. CDDP: CISPLATINO. NaCl: SOLUCIÓN FISIOLÓGICA. PEATC: REALIZACIÓN DE POTENCIALES AUDITIVOS DE TRONCO CEREBRAL. HSP-70: PROTEÍNA DEL CHOQUE TÉRMICO-70. ATP: ADENOSÍN TRIFOSFATO. 48H: 48 HORAS. 7D: 7 DÍAS. 30D: 30 DÍAS

Grupo 1.- En los 36 animales del trabajo 1 se realizó análisis Western-blot para la expresión de la HSP-70 en el lisado coclear.

En este grupo la distribución fue la siguiente.

1a.- (n=10). Animales sacrificados a las 48 horas de la administración de 5 mg/Kg de CDDP.

1b.- (n=10). Animales sacrificados a los 7 días de la administración de 5 mg/Kg de CDDP.

1c.- (n=10). Animales sacrificados a los 30 días de la administración de 5 mg/Kg de CDDP.

1d.- (n=6). Animales control sacrificados a las 48 horas (n=2), los 7 días (n=2), y los 30 días (n=2), de la administración de 1 ml de una solución de NaCl al 0'9%.

De acuerdo a estudios previos⁶⁷ en los cuales la mayor expresión de HSP-70 se produce a los 7 días de la inyección de CDDP se incluyeron 8 animales más.

Grupo 2.- (n = 4) Animales sacrificados a los 7 días de la inyección de 5 mg/Kg de CDDP.

Grupo 3.- (n = 4) Animales control sacrificados a los 7 días de la inyección de 10 ml/Kg de Cloruro sódico al 0'9%.

Se estudió la actividad de las caspasas-3/7 y la caspasa-9, los niveles de ATP, el análisis por inmunofluorescencia de la proteína caspasa-3 y de la HSP-70 en secciones cocleares, la presencia de HSP-70 en sangre periférica por Western-blot y la capacidad auditiva mediante PEATC.

5.2. Resultados:

5.2.1. Cálculo de los umbrales de audición mediante PEATC.

En la tabla 14 se muestran los cambios en los umbrales auditivos obtenidos en animales del grupo tratado con CDDP y del grupo control. Todos los animales del grupo tratado con CDDP mostraron

un aumento significativo de los umbrales auditivos a los 7 días de la administración. En el grupo control no se demostraron alteraciones significativas.

Grupo	Pretratamiento	Sacrificio
Control (n=4)	14'80	14'70
CDDP 7 días (n=4)*	12'41	24'00

TABLA 14. MEDIA DE LOS UMBRALES AUDITIVOS OBTENIDOS EN AMBOS GRUPOS EN ESTADO BASAL Y PREVIOS AL SACRIFICIO.
*p<0'05.

5.2.2. Expresión de la proteína HSP-70 en la cóclea de animales tratados con CDDP.

Se monitorizó la expresión de la proteína HSP-70 mediante Western-blot como indicador precoz de estrés homeostático en los extractos proteicos totales de cóclea de rat SD. Los resultados expresados en las figuras 47 y 48 muestran cómo la expresión de la proteína HSP-70 aumentó claramente con el tratamiento con CDDP. Así, las ratas del grupo sacrificado a las 48 horas (5606 ± 150 RLUs), y a los 30 días (4812 ± 447 RLUs) mostraron un incremento de la expresión de la HSP-70 comparándolas con el grupo control (3353 ± 479 RLUs) con un valor de $p < 0'05$. Así mismo, las ratas del grupo de 30 días mostraron una menor expresión de la HSP-70 comparándolas con el grupo de 7 días ($p < 0'05$) y el grupo de 48 horas (resultado estadísticamente no significativo).

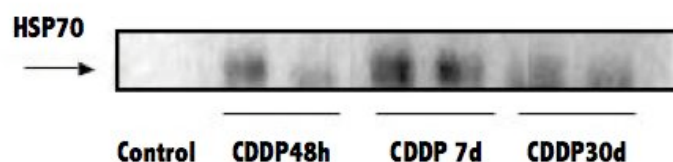


FIGURA 47. WESTERN-BLOT REPRESENTATIVO DE LA EXPRESIÓN DE LA HSP-70 EN EXTRACTOS COMPLETOS DE CÓCLEA DE RATAS SD SACRIFICADAS A LAS 48 HORAS, A LOS 7 DÍAS Y A LOS 30 DÍAS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CDDP.

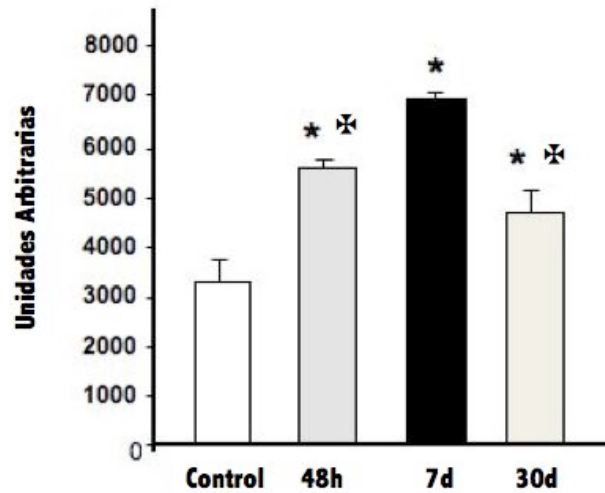


FIGURA 48. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO CUANTITATIVO DE LA EXPRESIÓN DE LA HSP-70 MEDIANTE WESTERN-BLOT EN EXTRACTOS DE CÓCLEA DE RATA SD SACRIFICADOS A LAS 48 HORAS (48h), LOS 7 DÍAS (7d) Y LOS 30 DÍAS (30d). * $p < 0.05$ FRENTE AL GRUPO CONTROL. ✕ $p < 0.05$ FRENTE AL GRUPO DE 7 DÍAS. RESULTADOS EXPRESADOS EN UNIDADES ARBITRARIAS.

5.2.3. Western blot y contenido proteico.

En los mismos extractos cocleares se midió la actividad de las caspasas-3/7 (figura 49) la cual estaba aumentada en los grupos tratados con CDDP en comparación al grupo control. (diferencia de 1.8 ± 0.4 RLUs). $p < 0.05$.

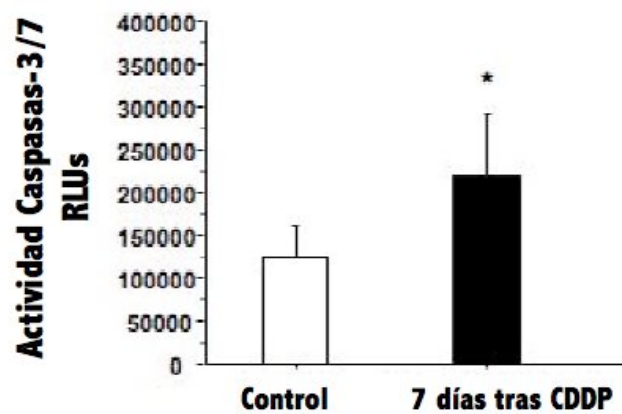


FIGURA 49. NIVELES DE ACTIVIDAD DE LAS CASPASAS-3/7 EN EXTRACTOS COCLEARES EN EL GRUPO TRATADO CON CDDP FRENTE AL GRUPO CONTROL. * $p < 0.05$.

Se añadió el análisis de la actividad de la caspasa-9 (figura 50) la cual estaba aumentada en el grupo tratado con CDDP y sacrificado a los 7 días (diferencia de $3'34 \pm 0'14$ RLUs) frente al grupo control.

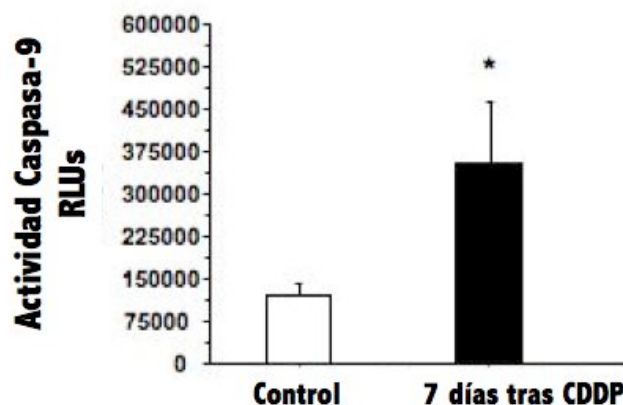


FIGURA 50. NIVELES DE ACTIVIDAD DE LA CASPASA-9 EN EXTRACTOS COCLEARES EN EL GRUPO TRATADO CON CDDP FRENTE AL GRUPO CONTROL. * $p < 0'05$.

5.2.4. Tinción por inmunofluorescencia de caspasa-3 y de HSP-70.

Se seleccionaron cortes cocleares de animales sacrificados a los 7 días de la inyección de CDDP. Se compara la fijación de la HSP-70 (figuras 51 y 52) y de la caspasa-3 (figura 53) cuya diferencia fundamental es la presencia de fijación en las CCE con la caspasa-3 pero no con la HSP-70. Como control se ha usado el colorante fluorescente para la tinción de ADN, DAPI tanto en grupos control como en el grupo de tratamiento.

Los datos muestran cómo los anticuerpos anti-HSP-70 se fijan en el limbo espiral, las células de soporte, la membrana basilar y la pared lateral. Es interesante resaltar que las células ciliadas no muestran tinción significativa. La inmunofijación de los antiHSP-70 era especialmente llamativa en la células interdendríticas del limbo espiral y en la prominencia espiral. (Figura 51).

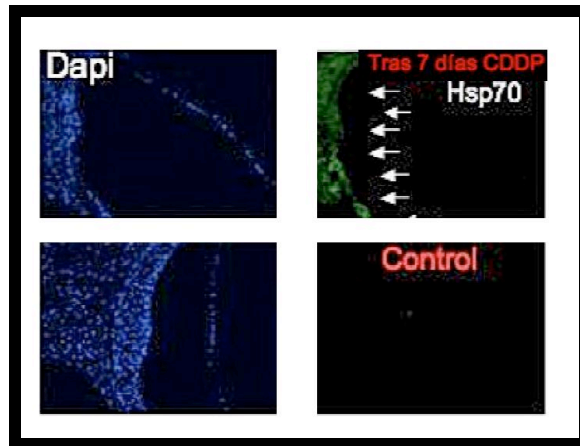


FIGURA 51. TINCIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA DE LA HSP-70 EN POBLACIONES CELULARES DE LA PARED LATERAL COCLEAR TRAS 7 DÍAS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CDDP. COMPÁRESE CON LA INMUNOTINCIÓN CON 4',6-DIAMINO-2-FENILINDOL DICLORHIDRATO EN LA PARTE IZQUIERDA DE LA FOTO Y CON EL GRUPO CONTROL EN LA PARTE INFERIOR DERECHA.

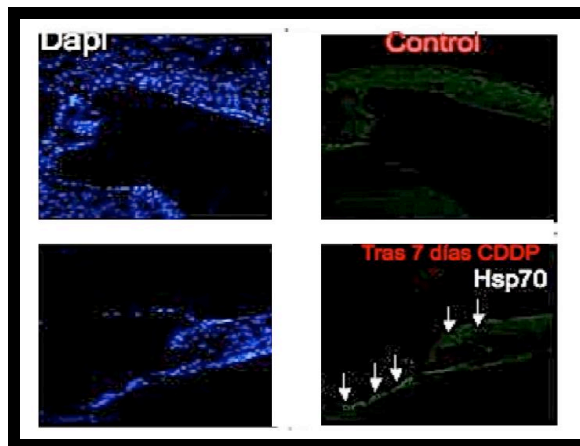


FIGURA 52. TINCIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA DE LA HSP-70 EN POBLACIONES CELULARES DEL ÓRGANO DE CORTI TRAS 7 DÍAS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CDDP. COMPÁRESE CON LA INMUNOTINCIÓN CON 4',6-DIAMINO-2-FENILINDOL DICLORHIDRATO (DAPI) EN LA PARTE IZQUIERDA DE LA FOTO Y CON EL GRUPO CONTROL SIN TRATAMIENTO EN LA PARTE SUPERIOR DERECHA. NÓTESE LA TINCIÓN PREFERENTE DE LAS CÉLULAS DE SOPORTE, LA MEMBRANA BASILAR Y EL LIMBO ESPIRAL.

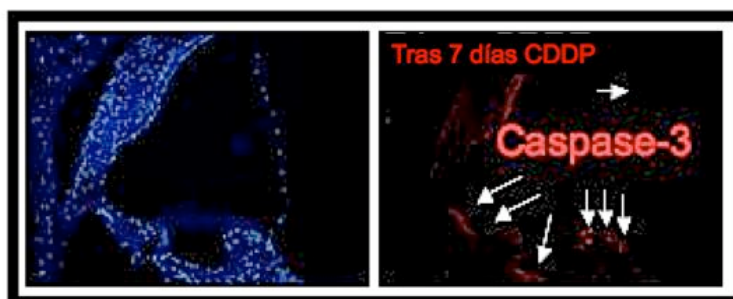


FIGURA 53. TINCIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA DE LA CASPASA-3 EN POBLACIONES CELULARES DEL ÓRGANO DE CORTI TRAS 7 DÍAS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CDDP. COMPÁRESE CON LA INMUNOTINCIÓN CON 4',6-DIAMINO-2-FENILINDOL DICLORHIDRATO EN LA PARTE IZQUIERDA DE LA FOTO. NÓTESE LA TINCIÓN PREFERENTE DE LAS CÉLULAS CILIADAS EXTERNAS Y EN LAS CÉLULAS INTERDENDRÍTICAS DEL LIMBO ESPIRAL.

5.2.5. Cuantificación de los niveles de Adenosín-trifosfato

Los niveles de ATP (como indicador del estado metabólico) presentes en el extracto disminuyeron significativamente en el grupo tratado con CDDP y sacrificado a los 7 días. (diferencia de $1'30 \pm 0'28$ RLUs), $p \leq 0'05$. (Figura 54).

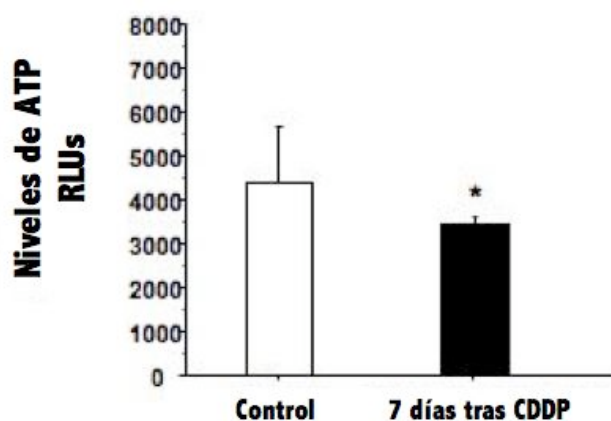


FIGURA 54. NIVELES DE ADENOSÍN TRIFOSFATO (ATP) EN LOS EXTRACTOS PROTEICOS TOTALES DE CÓCLEA DE RATA SD SACRIFICADAS A LOS 7 DÍAS DE LA INYECCIÓN DE CDDP. RESULTADOS EXPRESADOS EN UNIDADES RELATIVAS DE LUMINISCENCIA (RLUs). * $p < 0'05$ FRENTE AL GRUPO CONTROL.

5.2.6. Expresión y cuantificación en tejido coclear de la HSP-70.

El Western-blot representativo de la expresión de la HSP-70 se muestra en la figura 55 a los 7 días de tratamiento con CDDP. El análisis densitométrico de al menos tres experimentos independientes confirma que el tratamiento con CDDP aumenta significativamente la expresión de la proteína HSP-70 en la cóclea de rata SD. (20.781 ± 103 URL) frente a controles (13.512 ± 1.340) ($p \leq 0'05$).

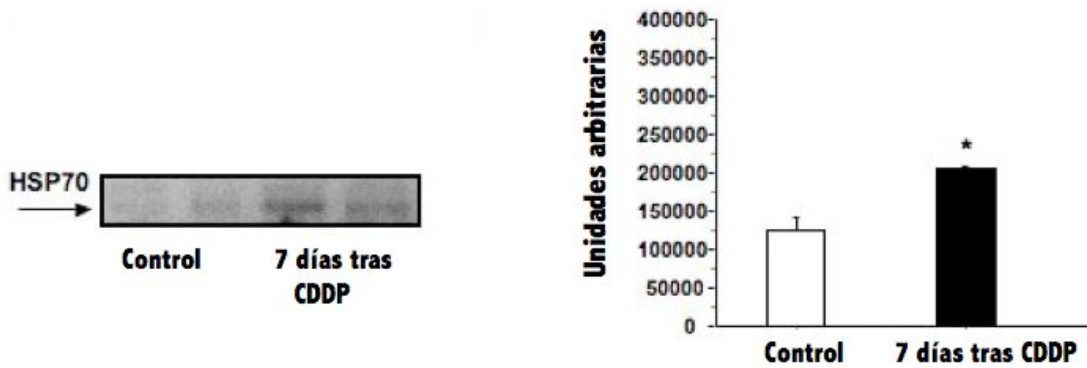


FIGURA 55. EN LA PARTE IZQUIERDA WESTERN-BLOT REPRESENTATIVO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HSP-70 EN LOS EXTRACTOS PROTEICOS TOTALES DE CÓCLEA DE RATA SD SACRIFICADAS A LOS 7 DÍAS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CDDP. EN LA PARTE DERECHA DE LA FIGURA SE MUESTRA EL ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO CUANTITATIVO DE LA EXPRESIÓN DE LA HSP-70 MEDIANTE WESTERN-BLOT EN EXTRACTO DE CÓCLEA DE RATA SD. * $p < 0.05$.

5.2.7. Detección de la HSP-70 en el suero de rata SD.

Se ha realizado un análisis por Western-blot para la detección e identificación de la HSP-70 en el suero de rata SD a los 7 días de la administración de CDDP. El Western-blot era positivo en un 75%. Ninguno de los animales del grupo control (0%) mostró positividad frente a la HSP-70. (Tabla 15).

Grupo-Espécimen.	TRATAMIENTO	DETECCIÓN HSP-70
2-1	CDDP	Positivo
2-2	CDDP	Negativo
2-3	CDDP	Positivo
2-4	CDDP	Positivo
3-1	NaCl 0'9%	Negativo
3-2	NaCl 0'9%	Negativo
3-3	NaCl 0'9%	Negativo
3-4	NaCl 0'9%	Negativo

TABLA 15. ANÁLISIS WESTERN-BLOT CUALITATIVO PARA LA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO DE LA PROTEÍNA DE 68 KDA (HSP-70) EN EL SUERO DE LA RATA SD. EL RESULTADO ES POSITIVO (75%) EN UNA PROPORCIÓN MUY SUPERIOR EN LOS ANIMALES TRATADOS CON CDDP Y SACRIFICADOS A LOS 7 DÍAS FRENTE AL GRUPO CONTROL (0%)

1. Mecanismo de acción del CDDP.

El mecanismo de acción del CDDP implica la entrada en la célula tumoral y su disolución en el citoplasma para transformarlo en sus distintas formas hidrolizadas, derivadas de la evolución en medio acuoso, para hacerlo más reactivo con sus dianas intranucleares. Algunas de estas formas son más activas que la molécula original. (Figura 56).

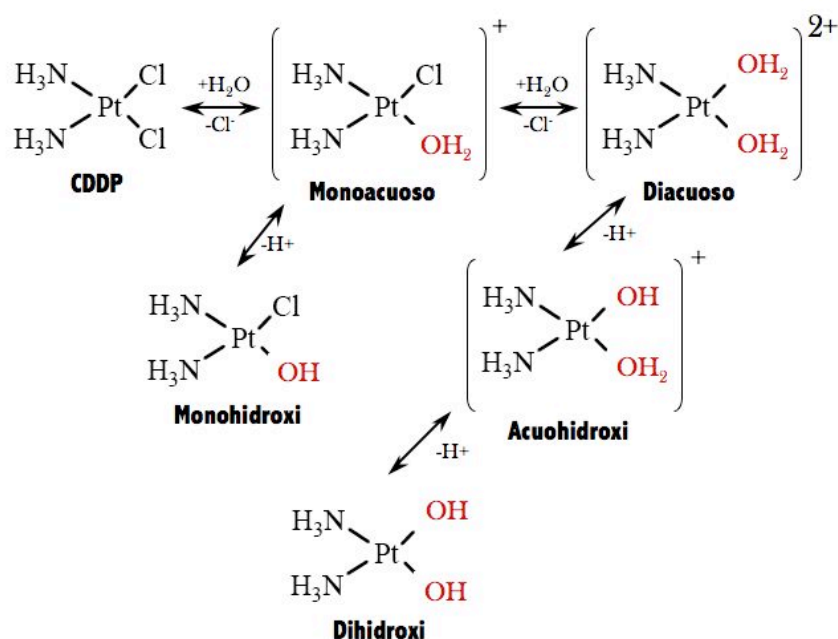


FIGURA 56. EVOLUCIÓN DEL CISPLATINO EN UN MEDIO ACUOSO.

El CDDP alcanza el interior de la célula mediante un mecanismo de difusión pasiva como molécula neutra. Sin embargo, aunque esta difusión pasiva parece ser el proceso dominante, no se pueden descartar otro tipo de vías de entrada que podrían implicar un transporte mediado por proteínas como el cotransportador de cobre CTR1. Algunos autores proponen un mecanismo mixto, y aunque existen evidencias bioquímicas y biológicas para soportar dicha hipótesis, aún se está lejos de dar una explicación completa del proceso.

El átomo de platino forma enlaces covalentes con el ADN en las bases purínicas (Guanina o Adenina) en las posiciones N7. Tras una nueva hidrólisis desplaza el ligando cloruro uniéndolo al platino a

una segunda base nucleótida, éste es el llamado Aducto CDDP-ADN (en terminología química unión de dos elementos que produce una adhesión para formar un único elemento)⁹⁴⁻⁹⁵. La formación de aductos CDDP-ADN produce una alteración de la cadena en sí por las uniones intracatenarias e intercatenarias que llevan a dos mecanismos de lesión a nivel molecular. Por un lado la unión del CDDP al ADN y a proteínas nucleares produce una alteración de la conformación espacial de la doble hélice en forma de bucles los cuales impiden la correcta transcripción del ADN. Por otro lado la alteración conformacional del ADN es incapaz de ser reparada, debida a la especificidad de las proteínas reparadoras por una cadena de ADN intacta, lo cual lleva a considerar al CDDP como un fármaco que inhibe la replicación y transcripción celular y que además altera el sistema de reparación del ADN. (Figura 57).

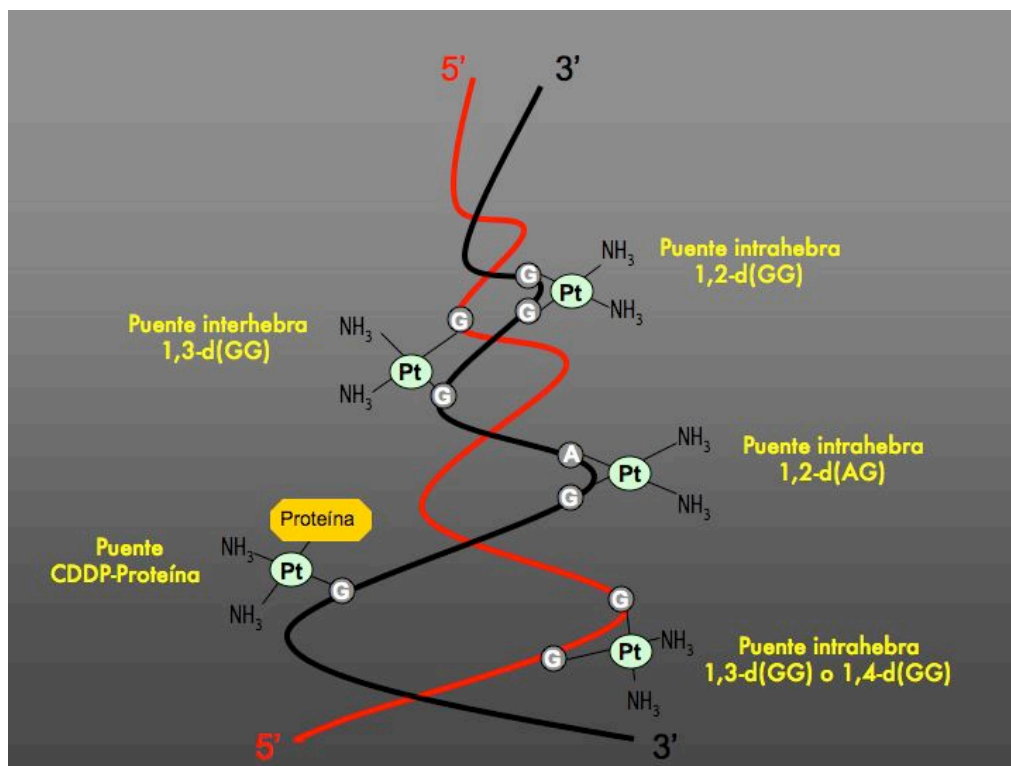


FIGURA 57. ADUCTOS MÁS COMUNES EN LA INTERACCIÓN DEL CISPLATINO-ADN. MODIFICADO DE ESTEBAN-FERNÁNDEZ D⁹⁶.

2. Mecanismos de ototoxicidad por CDDP

2.1. Ototoxicidad por CDDP.

En los últimos años se han investigado algunos de los mecanismos por los cuales el CDDP produce lesiones a nivel coclear y vestibular afectando la calidad de vida de los pacientes que lo han recibido durante un tratamiento quimioterápico.

Dado que la nefrotoxicidad se ha ido controlando con peritratamientos hidratantes y protectores como el tiosulfato y la neurotoxicidad no suele ser evidente hasta pasado un plazo medio desde la dosis de CDDP, actualmente la ototoxicidad se ha convertido en el más importante factor limitante de la dosis de CDDP que podemos dar a los pacientes oncológicos.

La ototoxicidad por CDDP se manifiesta principalmente como una HNS asociada o no a la aparición de acúfenos. En ocasiones excepcionales provoca efectos sobre el sistema vestibular produciendo alteraciones del equilibrio. El efecto puede ser detectado por el paciente o mediante exploración en horas o días tras la infusión de CDDP. La pérdida auditiva parece ser dosis dependiente, acumulativa, bilateral, simétrica y habitualmente irreversible, iniciándose en el rango de las altas (2-8 KHz) y de las ultra-altas frecuencias (12 -20 KHz). En caso de mantener el tratamiento con CDDP la HNS puede progresar hasta afectar a las frecuencias conversacionales⁹⁷.

Aproximadamente un 36% de los adultos y entre un 60 y un 100% de los pacientes pediátricos que reciben tratamientos con CDDP van a desarrollar algún tipo de alteración auditiva demostrada con audiometría tonal liminar (ATL) convencional, otoemisiones acústicas con productos de distorsión o AUAF⁹⁸⁻¹⁰⁰. En animales los efectos electrofisiológicos y auditivos han sido más estudiados, comprobándose la reducción del potencial endococlear¹⁰¹, la elevación del umbral del potencial de acción compuesto y del potencial microfónico coclear¹⁰², así como la alteración de las OEAPD¹⁰³ y de los PEATC¹⁰⁴. Es cierto que existe una alta variabilidad interindividual en la susceptibilidad al daño coclear

por CDDP, pero en líneas generales se pueden dar como factores de riesgo para desarrollar una HNS por CDDP la dosis acumulada, la edad (niños menores de 5 años o adultos mayores de 60 años), la insuficiencia renal y la pérdida auditiva o exposición sonora previa al tratamiento. En el caso de tratamiento por un carcinoma de nasofaringe recibir una radiación mayor a 48 Grays aumenta las posibilidades de HNS por CDDP ya que las radiaciones ionizantes pueden afectar a la integridad del tejido coclear y del nervio auditivo¹⁰⁵⁻¹⁰⁶. También las mutaciones en genes mitocondriales¹⁰⁷ o de la proteína Megalina¹⁰⁸ (presente en las células marginales con demostrado acúmulo de aductos de ADN por CDDP) o alelos específicos del gen de la Glutathione-S-Transferasa¹⁰⁹ pueden predisponer a la ototoxicidad por CDDP. El hecho de que ciertas alteraciones genéticas que pueden afectar a poblaciones celulares diferentes a las CCE y a las CCI y a funciones fisiológicas de reparación de las propias células apoya la hipótesis de un daño coclear inducido por CDDP centrado en las poblaciones celulares adyacentes al órgano de Corti encargadas del mantenimiento de la funcionalidad de las células sensoriales y en los procesos de compensación de la oxidación intracelular y de la promoción de la apoptosis de las células de soporte, del limbo espiral y en último término de las células ciliadas y las células ganglionares.

2.2. Efectos del CDDP sobre la morfología coclear.

En diversos estudios experimentales se ha sometido a diferentes animales vía intraperitoneal a distintas dosis y pautas de administración de CDDP, en primer lugar para determinar los fenómenos morfológicos primordiales en distintas secuencias temporales y en segundo lugar con la intención de cuantificar la acumulación final de los derivados platinados en el oído interno en relación a otros tejidos, a la pérdida auditiva y a la forma de administración. En la figura 58 podemos observar la anatomía básica en un corte transversal del órgano de Corti.

Cuando se administra una dosis prácticamente letal de CDDP (>15 mg/Kg) y se analizan mediante MEB los cambios en el órgano de Corti de cobaya a las 48 horas observamos una destrucción

absoluta de todos los elementos celulares del órgano de Corti que dejan residuos de la membrana sin evidencia de elementos celulares reconocibles, persistiendo únicamente estructuras deformadas que pueden corresponder a las células de los pilares de estructura fibrilar. También se evidencia un reclutamiento de macrófagos procedentes del modíolo que digieren los restos apoptóticos de las células destruidas.

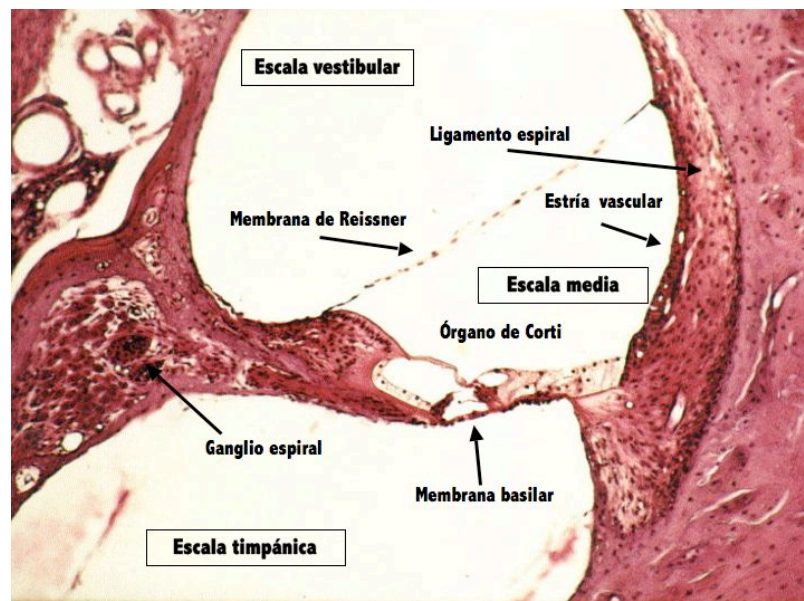


FIGURA 58. ANATOMÍA DEL ÓRGANO DE CORTI EN VISIÓN DE MICROSCOPIA ÓPTICA. SECCIÓN TRANSVERSAL. TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA. MODIFICADO DE GARCÍA BERROCAL JR¹¹⁰.

Posteriormente estudiando el resultado de una dosis equivalente pero repartida en dos inyecciones, una de 10 mg/Kg y otra de 5 mg/Kg a la semana y estudiando los cambios por MEB en animales sacrificados a los 30 días descubrimos que el órgano de Corti mantiene su estructura tisular con una pérdida ocasional de CCE, preferentemente en la hilera proximal, y también microperforaciones de membrana coalescentes en la superficie cuticular de las células de Deiters. Las CCI que conservan sus penachos ciliares mostraban la formación de burbujas citoplasmáticas en distintos estadios madurativos. (Figuras 28 y 29).

Sin embargo al aportar una dosis bioequivalente a la humana (5 mg/Kg) los hallazgos fueron distintos.

Supervivencia 2 horas: Pérdida ocasional de CCE que coinciden con destrucción de las prolongaciones cuticulares de las células de Deiters. Las CCI y sus células de sostén estaban indemnes.

Supervivencia 6 horas: Aumento de las lesiones en las prolongaciones cuticulares de las células de Deiters y lesión de las dos hileras externas de las CCE. Desorganización de cilios de las CCI y apoptosis de las células de sostén inmediatas al sulcus interno.

Supervivencia 90 días. Mayor destrucción de las CCE, las CCI y de las células de sostén en la porción interna y externa del túnel de Corti.

Cuando administramos una dosis de 2'5 mg/Kg los cambios son superponibles a los obtenidos con 5 mg/Kg pero de menor intensidad.

	0-12 horas	12-24 horas	24-48 horas	4-10 días	30 días	90 días
CCE	<u>+</u> *	<u>++</u> *	<u>+++</u> *	++	+++	+
CCI	<u>+</u> *	<u>++</u> *	<u>+++</u> *	++	+++	+
Células Deiters	+	++	++	+++		
Fibroцитos	+	++	++	+++		
CMSV	++	++	+++	+	+	
Células Ganglionares	<u>+</u> *	<u>++</u> *	+	+++	+	
Deterioro auditivo	+	+	++	+++	+	+

TABLA 16. SECUENCIA DE EVENTOS EN EL DAÑO INDUCIDO POR CISPLATINO EN LA CÓCLEA DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. LOS DATOS SE REFIEREN A DOSIS BIOEQUIVALENTES A LAS USADAS EN HUMANOS. +*: DAÑO EXCLUSIVO EN DOSIS LETALES (>15 mg/Kg) NO EMPLEADAS EN LA PRÁCTICA CLÍNICA EN HUMANOS. CCE: CÉLULAS CILIADAS EXTERNAS. CCI: CÉLULAS CILIADAS INTERNAS. CMSV: CÉLULAS MARGINALES DE LA ESTRÍA VASCULAR.

Por lo tanto nos hemos planteado una revisión del lugar de actuación a nivel celular de la toxicidad por CDDP, asociado a un estudio funcional centrado en la cronología del daño y a la posible acumulación de sales platinadas en las diversas poblaciones del oído interno². (Tabla 16)

La ototoxicidad por CDDP tiene al menos cuatro principales dianas en la cóclea: Las células ciliadas del órgano de Corti, las células del ganglio espiral, las células de soporte y la pared lateral (estría vascular y ligamento espiral). En la tabla 17 se pueden observar las distintas localizaciones que puede tener la ototoxicidad inducida por CDDP según diversos autores.

Estudios en cobaya demuestran que el CDDP afecta principalmente al órgano de Corti en las CCE y en las neuronas del ganglio espiral. Las células tipo I del ganglio espiral sufren la separación de la vaina de mielina simultáneamente al daño estructural sobre las CCE¹²¹. Del mismo modo, las CCI también se verán lesionadas por los radicales libres generados y la depleción de agentes antioxidantes a causa del daño oxidativo en la cóclea¹¹². En la estría vascular la ototoxicidad se manifiesta principalmente en la zona basal, como edema de la estría, abombamiento, ruptura y compresión de las células marginales con disminución del tamaño de las organelas citoplasmáticas¹¹¹, mientras que en cobayas se ha demostrado una contracción del área de la estría vascular y disminución del área celular con capacidad de recuperación del potencial endococlear a las 4 semanas¹¹³.

Las técnicas basadas en el reconocimiento de las uridinas, como la técnica *Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling* (TUNEL) se han empleado para la detección de ADN dañado en la cóclea del gerbo y son altamente específicas para la detección de células apoptóticas. Tras la administración de CDDP, se detecta apoptosis en las células del órgano de Corti, principalmente en las CCE y las células de ganglio espiral (especialmente las células tipo I) de la zona basal de la cóclea mientras que la estría vascular muestra positividad en las tres vueltas cocleares. La afectación de la pared lateral parece ser debida a la afectación de los canales de K⁺ ya que a dosis relativamente bajas de CDDP (5-10mg/Kg) no se aprecia daño de las CCE pero sí en la pared lateral¹²⁰. El ADN dañado se ha evidenciado mediante inmunolocalización en los núcleos de las CCE, en las células

de soporte, en las células marginales de la estría vascular y en las células de la zona basal de la estría vascular usando anticuerpos mono y policlonales contra los aductos de ADN. El primer lugar en que se forman parece ser las células marginales de la estría vascular¹¹⁷.

Autor	Año	CCE	CCI	Células de soporte	Fibrocyto pared lateral	CMSV	Ganglio espiral
Marco-Algarra ²²	1985	+					
Anniko ²⁵	1986	+		+			
Laurell ²⁴	1987	+	+				
Kohn ²⁹	1988					+	
Meech ¹¹¹	1998					+	
Watanabe ⁴⁵	2000			+			
Husain ¹¹²	2001	+	+				
Ramírez-Camacho ²	2002	+	+	+			
Sluyter ¹¹³	2003					+	
Ramírez-Camacho ⁹¹	2004	+		+			
Lee ¹¹⁴	2004						+
Liang ¹¹⁵	2005				+		
Bauer ¹¹⁶	2005	+	+				
Van Ruyven ¹⁰²	2005	+	+	+	+	+	+
Thomas ¹¹⁷	2006	+		+		+	
So ¹¹⁸	2007	+	+	+		+	
García-Berrocal ¹¹⁹	2007	+		+		+	
Rybak ¹²⁰	2007	+	+			+	+

TABLA 17. AFECTACIÓN DE LAS DISTINTAS POBLACIONES CELULARES DEL OÍDO INTERNO SEGÚN DIVERSOS AUTORES EN LA OTOTOXICIDAD POR CISPLATINO.

Las células de soporte parecen jugar un papel fundamental en la homeostasis del oído interno y en la ototoxicidad por CDDP⁹¹. Las células de Deiters y las células del pilar dan el soporte estructural a las CCE y forman la lámina reticular mediante su sistema de microtúbulos del citoesqueleto. Además tienen un papel análogo al de la glía del sistema nervioso central en la regulación del metabolismo y el flujo intracelular de K^+ . La abundancia de mitocondrias y la alta concentración de creatin-kinasa en la porción apical de éstas células atestiguan una alta capacidad metabólica implicada en el mantenimiento de la homeostasis¹²². La dispersión de la cromatina nuclear indica una alta tasa de transcripción ADN-ARN en las células de Deiters en comparación con las CCE. La cronología del daño por CDDP en el oído interno tras una dosis única de CDDP sugiere un empeoramiento de la función auditiva hasta 90-120 días después de la administración lo cual sostiene la teoría de la afectación de estructuras intermediarias que controlarían el funcionamiento de las CCE como son las células de Deiters. Mediante métodos inmunohistoquímicos como los utilizados en la sección experimental del presente trabajo se ha localizado una tinción de los núcleos de las células de soporte que se correlaciona con los hallazgos morfológicos y moleculares. El análisis cuantitativo de la acumulación de CDDP (figura I3) muestra una alta captación asociada a las proteínas de peso molecular similar al de las proteínas específicas del órgano de Corti (OCP1, OCP2 y oncomodulina)³⁶, las cuales están presentes principalmente en las células de soporte lo que sugiere una nueva vía fisiopatológica para el daño inducido por CDDP centrada en la lesión preferencial de las poblaciones celulares que controlan la homeostasis y la posible reparación y regeneración de las células sensoriales⁴⁰.

2.3. Efectos bioquímicos y moleculares del CDDP.

En cobayas sometidas a tratamiento con 10 mg/Kg de CDDP se ha demostrado una alteración del metabolismo del K^+ esencial para el mantenimiento del potencial endococlear y asociada a la

apoptosis de los fibrocitos del ligamento espiral y al efecto del CDDP sobre la estría vascular¹¹⁵ (figura 59). Esta alteración bioquímica produciría la aparición de cambios celulares denominados burbujas en la región apical (placa cuticular) de las células CCE y las CCI, cuya apariencia es la de protusiones esféricas de diverso tamaño en la membrana celular en la zona del kinocilio primitivo. Estas burbujas podrían ser debidas a la autorregulación de la presión intracelular. La célula tras la lesión por CDDP sufre la pérdida de osmolitos en un mecanismo de respuesta denominado “pérdida apoptótica de volumen”, con la consiguiente formación de estas estructuras que mantienen estable la forma y presión intracelular en ausencia de ATP. Como hemos demostrado en nuestros resultados el CDDP produce una depleción de ATP en el interior celular. Estas burbujas pueden aparecer de forma fisiológica o en respuesta a trastornos necróticos y apoptóticos. En el caso de la ototoxicidad por CDDP la aparición de estas burbujas se ha asociado a la presencia de pérdida auditiva en el animal de experimentación y, por lo tanto, a fenómenos no fisiológicos de necrosis y apoptosis de inicio precoz¹²³.

También las burbujas se forman rápidamente en las membranas apicales de las CCI en relación a un aumento de los niveles de Na^+ intracelular, por lo que se han relacionado con una alteración del equilibrio endocitosis-exocitosis^{2,123}.

El CDDP produce en el oído interno una alteración de los mecanismos de mantenimiento de la homeostasis hidroelectrolítica que afectan tanto al compartimento intracelular de las CCE, las CCI, las células de soporte y las células del ligamento espiral y la estría vascular como a la fisiología de los líquidos laberínticos. En la estría vascular, el CDDP es responsable de una actividad disminuida de las enzimas Sodio-potasio adenosíntrifosfatasa ($\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$) y Calcio adenosíntrifosfatasa ($\text{Ca}^{2+}\text{ATPasa}$) lo cual conduce a una alteración del metabolismo hidroelectrolítico intra y extracelular¹²⁴.

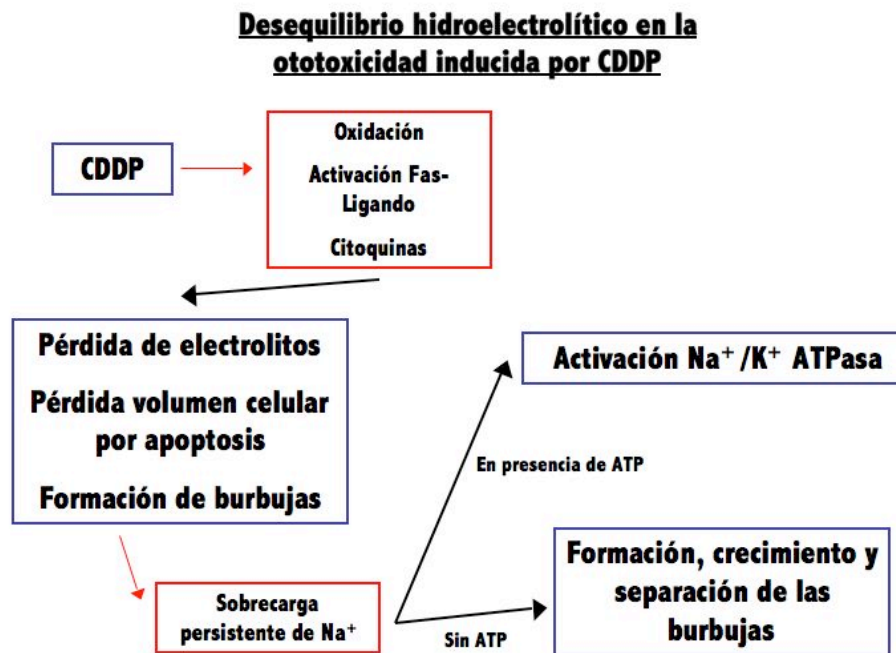


FIGURA 59. FORMACIÓN DE BURBUJAS EN SITUACIONES DE ESTRÉS CELULAR QUE CONDUCEN A LA PÉRDIDA DE VOLUMEN CELULAR POR ALTERACIÓN DEL EQUILIBRIO HIDROELECTROLÍTICO.

En un reciente estudio de García-Berrocal *et al*¹²⁵ se ha mostrado la relación de las poblaciones celulares del ligamento espiral y la estría vascular en el mantenimiento de la homeostasis del oído interno. Se han descrito cinco tipos de fibrocitos en el ligamento espiral los cuales están altamente especializados. Los fibrocitos con un papel metabólico y funcional se sitúan profundos o superficiales a la estría vascular poseyendo alto número de mitocondrias y prolongaciones citoplasmáticas, lo cual indica una elevada actividad metabólica. Esta actividad parece estar centrada en el mantenimiento de un flujo constante de electrolitos (especialmente K^+) hacia los líquidos laberínticos. Estas células tradicionalmente mencionadas como puramente estructurales expresan proteínas específicas del oído interno, algunas de ellas implicadas en los mecanismos moleculares de producción de HNS de carácter genético o tóxico como las conexinas (DFNA3-DFNB1), la coclina (DFNA9), la pendrina (síndrome de Pendred), y la otospiralina que podría tener una implicación en ciertas sorderas genéticas ya que su funcionalidad es necesaria para el mantenimiento de la viabilidad de las CCE y las células de soporte. Asimismo otras proteínas inespecíficas como la Na^+/K^+ ATPasa, el cotransportador $Na^+/K^+/Cl^-$ y la

anhidrasa carbónica, implicadas en el mantenimiento del potencial endococlear y la recirculación de K^+ están presentes de manera muy abundante en los fibrocitos funcionales y tienen un papel en la patogenia de la toxicidad por CDDP, la sordera súbita, la hipoacusia autoinmune y la presbiacusia. (Figura 60).

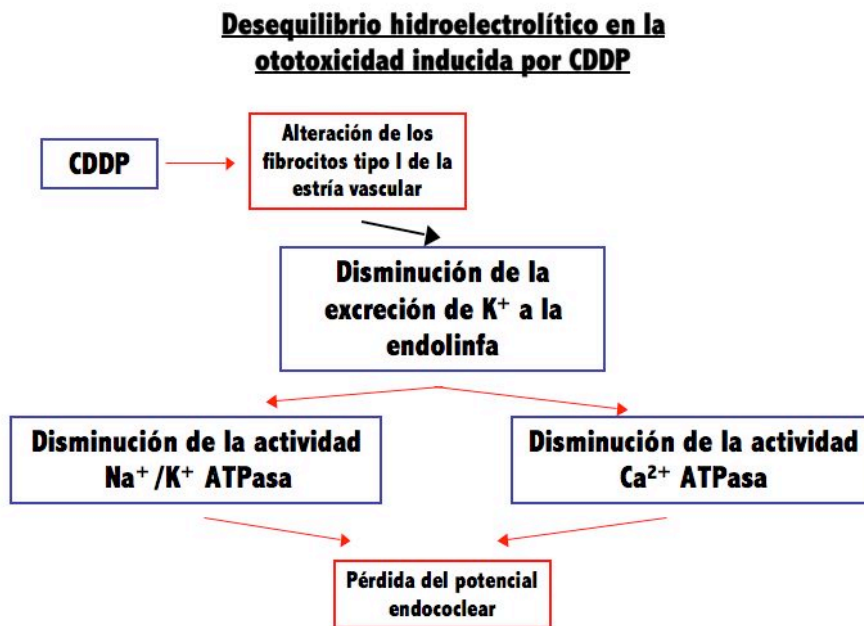


FIGURA 60. ALTERACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL POTASIO POR CDDP Y DEL MANTENIMIENTO DEL POTENCIAL ENDOCOCLEAR.

El CDDP genera además RLO incluyendo el NO, el peróxido de oxígeno(H_2O_2), el radical OH^- y el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Éstos imitan los efectos del CDDP sobre las CCE en experimentos *in vitro*. Los RLO pueden depleccionar los tejidos cocleares de compuestos protectores antioxidantes como el glutatión reducido o aumentar la proporción de compuestos oxidados como el glutatión oxidado, lo cual permitiría la peroxidación de proteínas estructurales dando como resultado la formación de peróxidos como $OOONO$ y de aldehídos como el 4-hidroxinonenal (4-HNE), extremadamente tóxicos, que al reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular favorecerían un influjo citoplasmático de Ca^{2+} con la consiguiente apoptosis celular¹¹⁴. (Figura 61).

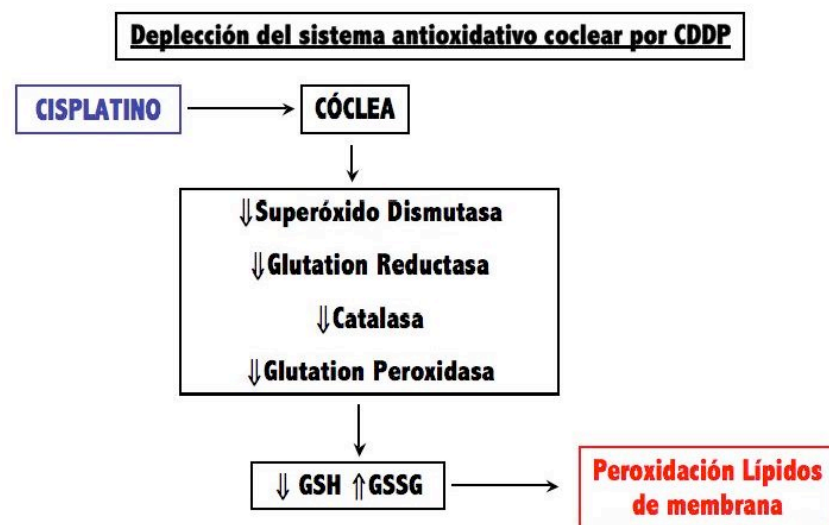


FIGURA 61. MECANISMOS DE ALTERACIÓN DEL SISTEMA ANTIOXIDATIVO POR CISPLATINO (CDDP). GSH: GLUTATION REDUCIDO. GSSG: GLUTATION OXIDADO.

La peroxidación lipídica puede ser la consecuencia de actividades defectuosas de las enzimas antioxidantes así como de la reducción del glutatión tisular. La reducción de la actividad enzimática antioxidativa intracoclear se debe a la unión del CDDP a grupos sulfidrilos enzimáticos; a la depleción del cobre y selenio necesarios para la SOD y la Glutation peroxidasa (GPx); al aumento de RLO; y a la depleción de glutatión y del cofactor Nicotinamida Adenina Dinucleótido-fosfato (NADPH) esenciales para la GPx y la Glutation Reductasa (GR)¹²⁰.

La isoforma NOX-3 de la NADPH oxidasa, exclusiva del tejido coclear también puede producir $O_2^{\cdot-}$ en respuesta a diversos estímulos como la exposición al CDDP¹²⁶.

El peróxido de hidrógeno se cataliza por el hierro para formar el radical OH^{\cdot} , altamente reactivo, que interacciona con los ácidos grasos poliinsaturados de membrana para formar el aldehído tóxico 4-HNE que tiene un papel predominante en la apoptosis de las CCE. (Figura 62).

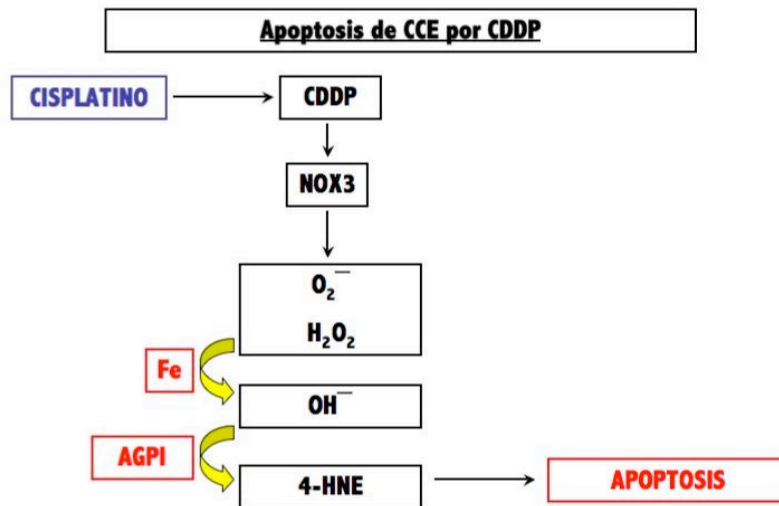


FIGURA 62. APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS CILIADAS EXTERNAS MEDIADA POR CISPLATINO (CDDP). Fe: HIERRO. CCE: CÉLULAS CILIADAS EXTERNAS. AGPI: ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE MEMBRANA. NOX3: ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA-3. O_2^- : IÓN SUPERÓXIDO. H_2O_2 : PERÓXIDO DE HIDRÓGENO. OH^- : RADICAL HIDROXILO. 4-HNE: 4-HIDROXINONENAL.

El O_2^- reacciona con el NO para formar OONO. Además la activación de citoquinas como el NF- κ B mediante la iNOS junto al 4-HNE parecen ser los iniciadores de la apoptosis de las células de la pared lateral. (Figura 63).

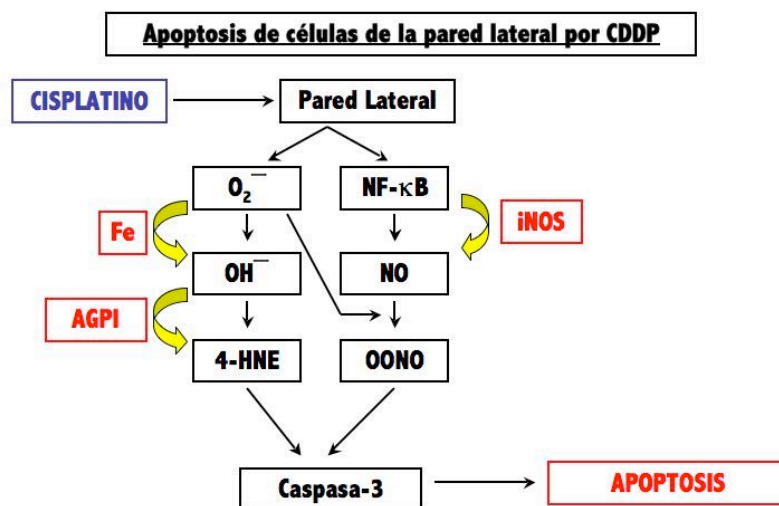


FIGURA 63. APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS DE LA PARED LATERAL DEL ÓRGANO DE CORTI MEDIADA POR CISPLATINO. NF- κ B: FACTOR NUCLEAR- κ B. O_2^- : IÓN SUPERÓXIDO. OH^- : RADICAL HIDROXILO. AGPI: ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE

MEMBRANA. 4-HNE: 4-HIDROXINONENAL. OONO: PEROXINITRITO. NO: ÓXIDO NÍTRICO. iNOS: ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA INDUCIBLE. Fe: HIERRO.

Mientras que en las células del ganglio espiral el CDDP aumenta la expresión de la proteína de alta movilidad (HMG1) que induce la activación de la óxido nítrico sintetasa inducida (iNOS) llevando a la formación de NO que junto ala formación de 4-HNE debida a los RLO y a los ácidos grasos poliinsaturados de membrana produce la muerte celular por apoptosis¹¹⁴. (Figura 64).

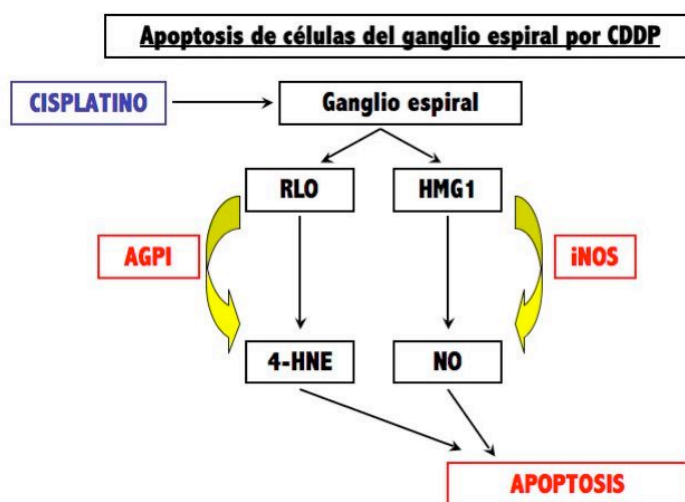


FIGURA 64. APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS DEL GANGLIO ESPIRAL MEDIADA POR CISPLATINO. RLO: RADICALES LIBRES DEL OXÍGENO. AGPI: ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE MEMBRANA. 4-HNE: 4-HIDROXINONENAL. HMG1: GRUPO DE ALTA MOVILIDAD-1. NO: ÓXIDO NÍTRICO. iNOS: ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA INDUCIBLE.

Los RLO pueden activar la proteína Bax citosólica, según hemos demostrado en nuestros resultados, alterando el metabolismo mitocondrial y causando una liberación de Citocromo-C al citosol. Esta entrada de Citocromo-C activa las caspasas 3 y 9, produce en cobayas la ruptura de la cadena de ADN por la desoxirribonucleasa activada por caspasas y la segmentación de la α -fodrina en la placa cuticular de las CCE dañadas por la caspasa-3 llevando la célula a la apoptosis¹²⁷.

En los fibrocitos del ligamento espiral de la pared lateral el CDDP induce la apoptosis por la activación de los canales de K^+ que produce la salida del mismo. Esto conduce a la disminución del potencial endococlear generado en la estría vascular. Por otro lado un mantenimiento externo de los niveles fisiológicos de K^+ inhibe la actividad apoptótica¹¹⁵.

La citoquinas inflamatorias como la Interleuquina (IL) -1β , la IL-6 y el TNF- α también pueden actuar como mediadores del daño ototóxico por CDDP. Pueden ser estimuladas por la activación de la Kinasa Reguladora Extracelular (ERK) y del Factor nuclear- κ B (NF- κ B) demostrada en cultivo de células OC1. El TNF- α se ha localizado principalmente por inmunoanálisis en el ligamento espiral, el limbo espiral y el órgano de Corti. La expresión proteica del NF- κ B era marcada en las regiones donde existían células con tinción positiva en la técnica TUNEL con alta sensibilidad para la detección de células apoptóticas, como en el órgano de Corti, en el ligamento espiral y en la estría vascular¹¹⁸.

La unión del dominio HMG1 al ADN se asocia a la acción antineoplásica del CDDP. El aumento de la expresión de la proteína HMG1 y su unión al ADN en los tejidos diana puede ser un factor sensibilizante para citotoxicidad. Ésta proteína se expresa abundantemente en las células del ganglio espiral pero se desconoce si se aumenta su expresión en al órgano de Corti o la pared lateral tras la administración de CDDP.

3. Mecanismos de protección frente a la ototoxicidad por CDDP.

3.1. Mecanismos de protección endógenos frente a la toxicidad coclear por CDDP.

La cóclea tiene mecanismos endógenos de protección ante el estrés oxidativo causado por agentes químicos como el CDDP (tabla 18). Algunas de las proteínas protectoras son:

1.- El glutatión y el sistema enzimático antioxidante GR, GPx, SOD y NADH.

Los inhibidores del glutatión (butionina sulfoximina) aumentan significativamente el daño producido por CDDP mientras que la N-acetilcisteína, precursora de la síntesis de glutatión parece disminuir la ototoxicidad⁴⁴.

MECANISMOS ENDÓGENOS DE PROTECCIÓN FRENTE A LA OTOTOXICIDAD POR CDDP EN EL OÍDO INTERNO	
Antioxidantes	Glutatión y sus enzimas: Catalasa, GR, GPx. Otras enzimas antioxidantes: NADH y SOD
Proteínas de reparación	Proteínas del choque térmico (HSP)
Estímulo de enzimas antioxidantes	Receptores de Adenosina A1
Antiinflamación y antiapoptosis	HO-1 y NRF-2
Regeneración del daño tisular	KIM-1
Protección antioxidante	Manipulación pH intracelular

TABLA 18. MECANISMOS DE PROTECCIÓN ENDÓGENOS FRENTE A LA TOXICIDAD POR CISPLATINO. CDDP: CISPLATINO. GR: GLUTATION REDUCTASA. GPx: GLUTATION PEROXIDASA. NADPH: NICOTINAMIDA DINUCLEÓTIDO FOSFATO OXIDASA. SOD: SUPERÓXIDO DISMUTASA. HO-1: GEN DE LA HEMO-OXIGENASA-1. NRF-2: FACTOR RELACIONADO CON EL FACTOR NUCLEAR ERITROIDE 2. KIM-1: MOLÉCULA DEL DAÑO RENAL-1.

2.- El sistema de las HSP.

Las HSP-27, 70, 72 y 90 han demostrado protección de células sensoriales del oído interno mediante la inhibición de la secuencia peptídica que conduce a la apoptosis celular¹²⁸. La HSP-72 se ha hallado en la cóclea de animales de experimentación sometidas a tratamientos con CDDP mientras que mediante Western-blot tras una dosis única de CDDP la detección de HSP-70 disminuyó significativamente en animales sacrificados a largo plazo frente a los animales sacrificados a los 7 días de la inyección de CDDP, lo que sugiere que la HSP-70 podría ser un marcador precoz de en sangre periférica del daño celular en órganos diana¹²⁹. Del mismo modo, la elevada expresión observada en los extractos tisulares cocleares en nuestros animales, sugiere un intento de disminuir los mecanismos apoptóticos de forma endógena. Este marcador ha demostrado ser inespecífico de órgano ya que también se detectó en tejido cerebral, renal y muscular.

3.- Los receptores de adenosina A1.

Los agonistas de los receptores de Adenosina A1 protegen morfológica y funcionalmente del daño producido por CDDP. Se ha demostrado que el CDDP produce una estimulación de los receptores de Adenosina A1 en la cóclea y que la aplicación de un agonista de estos receptores, la R-fenilisopropiladenosina (R-PIA) sobre la membrana redonda produce un incremento de la actividad antioxidativa¹³⁰.

4.- La hemo-oxigenasa-1 (HO-1) y el factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NRF-2)

La HO-1 es un gen protector con efecto antiinflamatorio y antiapoptótico mediado por los productos de degradación de la hemoglobina como el ión ferroso, el monóxido de carbono y la biliverdina. La generación de RLO se ve atenuada por la HO-1 y por un alcaloide sintético, la piperina, inductor de la HO-1. El efecto protector ante el CDDP de los salicilatos y el TNF- α parece también estar mediado por la HO-1¹³¹.

5.- La molécula del daño renal-1 (KIM-1).

El CDDP induce la expresión de la proteína KIM-1 del epitelio del túbulo proximal renal ayudando en la regeneración celular tras el daño producido por CDDP. La KIM-1 se expresa en la cóclea de rata y en cultivos celulares de CCE y se induce por la inyección de CDDP¹³².

6.- La manipulación del pH intracelular.

La alcalinización puede alterar de forma significativa la ototoxicidad del CDDP. El daño tóxico por CDDP se ve aumentado con un tampón ácido sobre la membrana redonda. Sin embargo la aplicación de tampones alcalinos reduce los cambios en los umbrales auditivos y la destrucción de CCE. Esto es debido a que los medios ácidos favorecen la formación de complejos monoacuosos del CDDP, con mayor capacidad tóxica que el propio CDDP¹³³.

3.2. Mecanismos de protección exógenos frente a la ototoxicidad por CDDP.

Existen diversas terapias estudiadas para hacer frente a la ototoxicidad inducida por CDDP en el oído interno, algunas de las más importantes están reflejadas en la Tabla 19.

3.3 Interferencia de los mecanismos exógenos de protección con el efecto antitumoral del CDDP.

En la literatura actual existen ciertas dudas sobre el efecto que los mecanismos protectores frente a la toxicidad por CDDP puedan tener sobre la eficacia antitumoral del fármaco en sí. Sólo desde la publicación por Rybak *et al*¹⁰⁴ en 2000 de resultados concernientes al efecto anti-ototóxico pero no inhibidor de la acción antitumoral por CDDP del dietilditiocarbamato (DDTC), el ebselen y el ácido 4 – metiltiobenzoico (MTBA) se ha abierto la puerta a los ensayos fase I en humanos de los inhibidores de la peroxidación de lípidos de membrana. Está demostrado que el tiosulfato de sodio interfiere con la acción antineoplásica del CDDP, por lo que su uso en humanos puede aumentar la tasa de fallo terapéutico. El uso diferido del tiosulfato parece no interferir en la eficacia terapéutica disminuyendo la

toxicidad frente al uso simultáneo. Sin embargo la N-acetilcisteína y la L-Metionina disminuyen la toxicidad y la apoptosis por CDDP en órganos sanos al administrarse simultáneamente al CDDP. Con D-Metionina se reduce el área bajo la curva de distribución de CDDP en un 30% con lo que podría limitar su uso en humanos.

MECANISMOS EXÓGENOS DE PROTECCIÓN FRENTE A LA OTOTOXICIDAD POR CDDP EN EL OÍDO INTERNO				
GRUPO	FÁRMACOS	AUTOR	AÑO	MECANISMO ACCIÓN
Antioxidantes	Tiosulfato de sodio	Wang ¹³⁴	2003	Neutralización RLO Excreción renal CDDP Precursor antioxidantes.
	N-Acetilcisteína	Bowers ¹³⁵	2002	Sustrato formación glutation
	Amifostina	Church ¹³⁶	2004	Antioxidante
	D- y L-Metionina	Korver ¹³⁷	2002	Quelantes de platino Neutralizan RLO
Neutralizadores de radicales libres	DDTC-Ebselen-MTBA-Salicilatos-MESNA	Rybak ¹⁰⁴	2000	Sustrato formación glutation Neutralizan RLO
Agonista receptores angiotensina A1	R-PIA	Ford ¹³⁸ Nie ¹³⁹	1997 1998	Aumento actividad GPx-SOD Quelante aldehídos
Inhibidor de canales Ca ²⁺	Flunarizina	So ¹⁴⁰	2005	Estímulo HO-1 y NRF2
Antiapoptóticos	Inhibidores de caspasas	Wang ¹²⁷	2008	Inhibición cascada apoptótica
Antiproteasas	Ácido lipoico	Rybak ¹⁰⁴	1999	Inhibidor proteasas Ca ²⁺ -dependientes
Terapia génica protectora y antiapoptótica	XIAP	Deveraux ¹⁴¹	1997	Bloqueo caspasas
	NT-3	Chen ¹⁴²	2001	Estímulo gen antiapoptótico
Inhibidores del p53	α -pifitrina	Zhang ¹⁴³	2003	Estímulo gen antiapoptótico

TABLA 19. MECANISMOS DE PROTECCIÓN EXÓGENOS FRENTE A LA TOXICIDAD POR CISPLATINO. DDTC: DIETILDITIOTIOCARBAMATO. MTBA: ÁCIDO 4-METILTIOBENZOICO. MESNA: 2-MERCAPTOETANOSOFONATO. R-PIA: R-FENILISOPROPILADENOSINA. NT-3: NEUROTROFINA-3 XIAP: PROTEÍNA INHIBIDORA DE LA APOPTOSIS LIGADA AL CROMOSOMA X. RLO: RADICALES LIBRES DEL OXÍGENO. GPx: GLUTATION PEROXIDASA. SOD: SUPERÓXIDO DISMUTASA. HO-1: GEN DE LA HEMOXIGENASA-1. NRF2: FACTOR RELACIONADO CON EL FACTOR NUCLEAR ERITROIDE 2.

La potencial interferencia con los efectos terapéutico del CDDP puede ser obviada con la administración intratimpánica o a través de la membrana redonda de fármacos protectores frente a la toxicidad por CDDP o de inhibidores de la oxidación, la apoptosis etc.. como se ha hecho en algunos modelos animales. El salicilato de sodio no interfiere la capacidad antitumoral del CDDP e incluso se ha demostrado una potenciación del efecto antineoplásico en combinación con ebselen y alopurinol en modelos animales de cáncer de ovario¹⁴⁴⁻¹⁴⁵.

4. Caracterización de la apoptosis como efectora de la ototoxicidad por CDDP.

Aunque el efecto ototóxico del CDDP en el animal de experimentación ha sido estudiado de forma extensa y exhaustiva, los mecanismos intracelulares por los que el CDDP induce la pérdida de CCE y la consecuente degeneración del órgano de Corti continúan siendo una incógnita. Incluso los sitios o ligandos celulares y nucleares de la adhesión, internalización y acumulación del CDDP todavía no han sido completa y debidamente identificados. Una de las maneras más importantes en las que los complejos de ADN-CDDP pueden producir la muerte celular es mediante la inducción de la apoptosis o muerte celular programada¹⁴⁶. Una amplia acumulación de complejos ADN-CDDP se ha observado en los núcleos de las células marginales de la estría vascular¹¹⁷ pero no en las CCE, tradicionalmente reconocidas como el órgano diana del daño celular inducido por CDDP²². La excesiva entrada de platino al interior nuclear de las células marginales representa el primer eslabón en la ototoxicidad a corto plazo por CDDP, provocando el deterioro funcional y la destrucción apoptótica. El daño puede llevar a una alteración del intercambio de K^+ en la estría vascular y a una disminución de la secreción de K^+ hacia la endolinfa con la consecuente disfunción y pérdida de las CCE. La alteración de los procesos de intercambio de K^+ , esenciales en la producción del potencial de acción endococlear, es uno de los efectos tóxicos de la administración de CDDP, y no sólo está mediado por el efecto proapoptótico directo del CDDP en la estría vascular, responsable de la disminución de la actividad de la $Na^+/K^+ATPasa$ y la $Ca^{2+}ATPasa$, sino también por la apoptosis de los fibrocitos funcionales del ligamento espiral^{115,124-125}.

La mayoría de las células marginales que se han visto afectadas por el efecto tóxico del CDDP, ya al tercer día muestran un aumento de la expresión de la forma activa de la caspasa-3¹⁴⁶, indicando que la cascada apoptótica mediada por caspasas es una de las formas por las cuales la ototoxicidad por CDDP se lleva a cabo en el interior celular. Sin embargo, también muestran un aumento de la expresión de la caspasa-9, lo cual supone que la apoptosis comienza por la permeabilización de la membrana mitocondrial. Los datos obtenidos por nuestro grupo demuestran la existencia de apoptosis mediada por

caspasas tras tratamiento intraperitoneal con CDDP en la cóclea de rata SD desde diferentes puntos de vista. La cuantificación de los niveles de ATP (que muestra una importante disminución tras la inyección de CDDP) en los extractos proteicos completos de cóclea de rata SD también apoyan la teoría de la intermediación de la cascada apoptótica en el daño celular producido por CDDP. (Figura Apop9). En las células que sufren el proceso apoptótico se ha demostrado la disminución de los niveles de ATP, en concordancia con el aumento del gasto energético provocado por la muerte celular por apoptosis. Nuestros datos apoyan la teoría de que la cascada apoptótica intrínseca o mitocondrial juega un papel principal en los procesos que conducen a la muerte celular en la cóclea de rata SD tras la administración de CDDP. Así, los extractos proteicos cocleares muestran un aumento progresivo de la expresión de la caspasa-9, con unos niveles máximos a la semana de tratamiento y un descenso evidente a los 30 días de tratamiento.

Es interesante que la activación de la caspasa-9 sea dependiente de la administración de CDDP y de la regulación de la expresión de la proteína Bax. Nuestros resultados, complementarios a los de estudios previos, muestran que la sobreexpresión de la proteína Bax y la infrarregulación de la proteína Bcl-2 en el órgano de Corti del gerbo (*Meriones unguiculatus*) expuesto a CDDP juegan un papel primordial en la activación, control y ejecución de la cascada de muerte celular intrínseca mitocondrial¹⁵. Aunque estudios previos mostraron que una activación inicial de la caspasa-8 podía inducir la activación de la caspasa-9⁵⁰ en nuestro estudio no hemos observado activación previa de la caspasa-8. La ausencia de activación de la caspasa-8 coincidió con un aumento de la actividad de la caspasa-9 lo cual confirma la teoría de una activación preferencial de la vía intrínseca en la ototoxicidad inducida por CDDP. Los animales con supervivencia a largo plazo tras la administración de CDDP (grupo sacrificado a los 30 días de tratamiento) presentaban unos niveles de actividad de caspasas, de expresión de las proteínas Bax y Bcl-2, y de ATP similares a los observados en el grupo control. La hipótesis más plausible podría ser que una vez que el estímulo tóxico inicial ha sucedido, las células desarrollan sus propios mecanismos de reparación intracelular. En consecuencia, cesan los mecanismos apoptóticos. Nuestros

resultados muestran cómo la toxicidad por CDDP en la cóclea de rata SD afecta en primer lugar a la estría vascular y a las células de soporte (células de Deiters y de Hensen) lo que conduce a una afectación del equilibrio hidroelectrolítico dependiente del K^+ en la endolinfa, y a una alteración de la homeostasis metabólica de las CCE y las CCI, que comienzan a experimentar alteraciones morfológicas y funcionales⁹¹. Actualmente estamos analizando con los mismos métodos el papel de los fibrocitos en las fases precoces de la toxicidad por CDDP.

Los mecanismos bioquímicos por los cuales el CDDP activa la cascada apoptótica intrínseca permanecen ocultos a los conocimientos actuales. Aunque es sabido que el CDDP se une al ADN nuclear y que esta interacción puede tener un papel fundamental en los efectos tóxicos que conducen a la apoptosis celular, parece ser que la mitocondria juega un papel principal y suficiente como organela diana del daño inducido por CDDP¹⁴⁷⁻¹⁴⁸. El CDDP puede conducir directamente a la generación de RLO o puede inducir por sí sólo la salida al medio citoplasmático de moléculas derivadas de la oxidación que estarían normalmente en el interior de la mitocondria, como el citocromo-C, generando así una reacción que conduciría a la activación de los mecanismos apoptóticos. El daño celular mediado por RLO puede ocurrir como consecuencia de la depleción de sustancias antioxidantes o de la peroxidación de los lípidos de la membrana celular y nuclear de las células de órgano de Corti de la rata SD¹⁴⁹. Datos de nuestra investigación muestran un aumento de la actividad de los RLO en los extractos cocleares de los controles similares a los de los grupos tratados con CDDP. Este hallazgo es compatible con los de Evans y Halliwell, en los cuales se evidenció una producción metabólica incesante de RLO en todas las estirpes celulares del oído interno independientemente de la exposición al CDDP¹⁵⁰. Nuestros resultados, sin embargo, no coinciden completamente con el concepto de daño celular inducido por la acumulación de radicales libres en las distintas organelas celulares.

El análisis de la actividad total de la enzima SOD muestra un aumento significativo de la actividad de esta enzima que tiene como objetivo principal el aclaramiento intracelular de RLO. Este hallazgo se justifica por el hecho de que la dosis de CDDP utilizada es relativamente baja (5 mg/Kg de peso del

animal) para intentar reproducir fielmente la administración terapéutica de CDDP que se utiliza habitualmente en humanos. En nuestro modelo, las células inicialmente aumentan la actividad de las enzimas antioxidantes, para minimizar el posible daño producido por RLO. La depleción de SOD se ha observado en modelos animales que han usado altas dosis de CDDP (16 mg/Kg de peso del animal)¹⁴⁹. Otro problema emergente referente al uso de altas dosis de CDDP en modelos experimentales son los diversos patrones de daño y muerte celular provocados en las distintas poblaciones celulares. A dosis más bajas los efectores proapoptóticos de la caspasa-8 y de la caspasa-9 y el efector material de la cascada apoptótica, la caspasa-3, se ven activados con el resultado final de la muerte celular programada. Por el contrario, la administración de altas dosis de CDDP, se acompaña de una disminución de la actividad de la caspasa-3, y de una muerte celular generalizada por necrosis¹⁵¹.

De acuerdo al análisis de inmunofluorescencia, los resultados tras la administración de dosis bioequivalentes de CDDP a la humana en la rata SD muestran un aumento de la expresión de la caspasa-3 en diversos tipos celulares dentro de la cóclea. Tradicionalmente se había atribuido un papel preponderante a las CCE en la ototoxicidad por CDDP²², sin embargo, nuestros hallazgos demuestran que poblaciones celulares distintas a las CCE pueden estar implicadas en la ototoxicidad mediada por CDDP. Así, las células del limbo espiral, las células del surco interno, las CCE y las CCI, y las células de soporte presentan una elevación de la actividad de la caspasa-3 tras la inyección intraperitoneal de CDDP. Del mismo modo, la membrana de Reissner y las células marginales de la estría vascular mostraron un incremento de la actividad apoptótica mediada por la caspasa-3¹¹⁹. Estos últimos hallazgos también han sido observados en la cóclea de cobaya tras exposición precoz a CDDP, mediante la detección de fragmentos de ADN de cadena simple¹⁵² y enlaces cruzados guanina-guanina en la cadena doble de ADN¹¹⁷, sugiriendo los autores de estos hallazgos el papel principal de las células marginales de la estría vascular en el daño precoz inducido por CDDP en la cóclea de cobaya. La afectación más extensa observada en nuestro estudio se justifica por la diferencia en los tiempos sucesivos de análisis tras la administración de CDDP; siete días frente a uno-tres días^{117,146}.

Un factor restrictivo para el estudio de las posibles terapias potenciales utilizables para minimizar la ototoxicidad por CDDP es la recuperación morfológica y funcional del órgano de Corti tras finalizar la administración de CDDP¹⁵³. Se han sugerido diversos mecanismos de compensación del daño producido por CDDP en el oído interno, algunos de ellos intrínsecos a la propia célula¹⁵³, otros dependientes del aclaramiento de la droga en el interior celular³⁶ y otros justificados por un daño secuencial en los distintos tipos celulares de la cóclea⁹¹. Así, el cese o la reversibilidad del daño inducido en las células marginales de la estría vascular, y los fibrocitos del ligamento espiral podría prevenir el daño al órgano de Corti. Esta hipótesis podría tener importantes implicaciones clínicas, ya que se ha publicado la recuperación ocasional en algún paciente de una pérdida auditiva de tipo neurosensorial tras exposición a agentes platinados. También es cierto que la distinta susceptibilidad individual al daño inducido por CDDP observada en nuestros animales podría explicarse por la hipótesis previa.

5. *Papel de la HSP-70 en la ototoxicidad por CDDP.*

Las HSP son parte de un sistema de respuesta al estrés celular activado por cambios en la homeostasis tisular debida a múltiples causas como la hipertermia, la isquemia y la exposición a tóxicos. A pesar de que Harris *et al*¹⁵⁴ habían propuesto que la HSP-70 era un marcador específico de la sordera inmunomediada estudios posteriores han demostrado que la HSP-70 es un marcador precoz de daño o muerte celular con implicaciones en los procesos defensivos ante el estrés celular¹²⁹. La inducción de la expresión de las HSP podría inhibir significativamente la apoptosis en el oído interno de los animales expuestos a CDDP proporcionando a la célula un mecanismo intrínseco de protección¹²⁸. La demostración de que la exposición a niveles tóxicos de ruido ambiental y a CDDP induce en un corto periodo de tiempo la síntesis de HSP-72 (forma inducible y activa de la HSP-70) en las CCE sugiere un efecto protector de la misma^{66,155}. Tanto la expresión de la HSP-72 como de su Ácido ribonucleico mensajero (ARNm) se observaron tras estrés hipertérmico de una manera más débil que ante la sobreestimulación acústica o por isquemia¹⁵⁶. La cóclea de cobaya sometida a estrés por hipertermia induce la expresión del ARNm de la HSP-72 en el limbo espiral, la estría vascular, la prominencia espiral, las células del ganglio espiral y el órgano de Corti¹⁵⁷. Las proteínas HSP pueden inhibir los mecanismos intrínsecos celulares asociados a la apoptosis inducida por drogas ototóxicas interfiriendo en la liberación del Citocromo-C, la activación de caspasas, y la fosforilación de la Kinasa NH-Terminal c-Jun (JNK)¹²⁸. Se ha demostrado que la HSP-70 se une al factor activador de proteasas de apoptosis (Apaf-1) inhibiendo el reclutamiento de caspasa-9 para el apoptosoma y neutralizando el Factor inductor de apoptosis (AIF). Además de inhibir la apoptosis la HSP-70 tiene un papel importante en la homeostasis celular regulando la reparación y la degradación de proteínas defectuosas¹⁵⁸.

En nuestras series la expresión de la HSP-70 en los lisados de tejido coclear¹¹⁹ y su detección en suero¹²⁹ son más pronunciadas a los 7 días de la inyección de CDDP lo cual confirma los resultados previos sobre la actuación de la HSP-70 como marcador serológico de ototoxicidad. Una vez

establecido el estímulo tóxico, la HSP-70 favorece la reparación tisular y los mecanismos antiapoptóticos, disminuyendo la tasa de muerte celular programada.

Los resultados morfológicos de inmunofijación de la HSP-70 a los 7 días en limbo espiral, células de soporte, membrana basilar y pared lateral y la ausencia de la misma en CCE¹¹⁹ son idénticos a los resultados obtenidos con HSP-72 tras estrés hipertérmico, isquemia y trauma acústico¹⁵⁷. Sin embargo Oh *et al*⁶⁶ describen un aumento de la expresión de la HSP-72 en las CCE tras tratamiento con CDDP. En este caso no se ha estudiado la influencia del tratamiento con CDDP en poblaciones celulares distintas a las CCE, se ha empleado una técnica de detección completamente distinta como es la técnica de superficie y las dosis administradas son dosis letales (10 y 20 mg/Kg de CDDP), mientras que el análisis de resultados se hace en minutos y horas tras la administración del CDDP, lo que hace que sus resultados no sean comparables. En nuestro caso la fijación de HSP-70 era especialmente llamativa en las células interdentes de la pared lateral y en la prominencia espiral. Aquellas células en las que la HSP-70 se expresa con mayor intensidad deberían tener mayor protección frente a la apoptosis que la células sin expresión.

De acuerdo con nuestros resultados, el CDDP induce alteraciones de los mecanismos reparadores con una mayor expresión a los 7 días de la inyección de CDDP. Las propiedades antiapoptóticas de la HSP-70 estarían encaminadas a mantener la integridad de las células del oído interno de una manera más efectiva en aquellas estructuras con una mayor expresión de HSP-70. Hipotéticamente estos mecanismos reparadores inducidos por la aplicación de CDDP producen un efecto protector frente a ototoxicidad en el oído interno pero podrían proveer a la célula cancerosa de mecanismos que disminuyan la efectividad del CDDP, ya que la HSP-70 ha demostrado un aumento de la tumorigenicidad en células neoplásicas¹⁵⁹. Se deberían desarrollar, por tanto, estrategias para aumentar la expresión de la HSP-70 en órganos diana de la toxicidad por CDDP al tiempo que se disminuye su expresión en el tejido tumoral. Una alternativa posible, sería la administración transtimpánica de

estimuladores de la HSP-70, que alcanzarían el oído interno mediante su difusión a través de la membrana de la ventana redonda.

6. Caracterización cuantitativa y morfológica de la inhibición de la apoptosis en la ototoxicidad por CDDP.

Hasta el momento, únicamente la perfusión intracoclear de inhibidores de caspasas ha proporcionado una eficiente protección frente a la ototoxicidad por CDDP reduciendo drásticamente la severidad de la pérdida auditiva y el nivel de apoptosis en animales de experimentación. Los efectos *in vivo* sobre los elementos energéticos de la pared lateral en un modelo de ototoxicidad por la toxina mitocondrial 3-nitropropiónica parecen otorgar un papel relevante a los inhibidores de caspasas en la protección frente a la ototoxicidad por CDDP¹⁶⁰.

En relación a nuestro modelo experimental se trata, hasta la fecha (última búsqueda bibliográfica en septiembre de 2008) y en nuestro conocimiento, del primer y único modelo de inhibición de la apoptosis mediada por CDDP en la rata SD en el que los inhibidores de caspasas se administran por una vía sistémica, siguiendo los hallazgos de Mizutari *et al*¹⁶⁰, que fueron capaces de demostrar una protección de las células de la pared lateral del órgano de Corti y un mantenimiento de la capacidad auditiva en ratas tratadas de forma sistémica con inhibidores de la apoptosis tras un tratamiento con toxina 3-nitropropiónica en pauta intraperitoneal en los días -1 a +1 de la administración de la toxina.

En nuestro modelo de ototoxicidad coclear con CDDP obtuvimos unos resultados muy llamativos en lo que se refiere a la inhibición de las denominadas caspasas efectoras (complejo de caspasas 3-7), (figura 41) que parece ser la responsable del mantenimiento de la capacidad auditiva en nuestros animales. En el caso de la inhibición de la caspasa-9 nuestros animales mostraron un aumento de la actividad de la caspasa-9, a pesar de haber recibido un tratamiento con inhibidor inespecífico de su actividad (Z-LEHD-FMK). Este hecho se puede explicar por tres causas principales (figura 65):

1. Una inhibición competitiva entre los dos inhibidores utilizados desplazando el Z-DEVD-FMK al Z-LEHD-FMK en su unión al ligando específico de la caspasa-9.

2. Una alteración de la especificidad de los inhibidores en medio *in vivo* ⁶³. Los inhibidores de caspasas más usados muestran un cierto grado de reactividad cruzada con otras caspasas, de hecho el inhibidor de caspasas 3 y 7 Z-DEVD-FMK muestra una inhibición completa de la caspasa-9 a altas concentraciones y una discreta inhibición de la caspasa-8. Asimismo el inhibidor de caspasa-9 Z-LEHD-FMK muestra una buena afinidad a bajas concentraciones hacia las caspasas 3 y 8 lo cual podría tener un efecto de sesgo en estudios que pretenden individualizar las vías extrínseca e intrínseca de la activación de las caspasas. Como demostraron Berger *et al* ¹⁶¹ el inhibidor de caspasa-9 Z-LEHD-FMK tiene una alta capacidad de inhibición de caspasas de la vía extrínseca (poco importantes en ototoxicidad por CDDP) así como de la caspasa-3, lo cual es coincidente con una gran inhibición de la actividad de la caspasa-3 efectora y escasa de la caspasa-9. Para solucionar este problema Berger *et al* han diseñado en su laboratorio unos inhibidores con mayor selectividad sustituyendo el grupo -FMK por un grupo aciloximetilcetónido (-AOMK). En el caso del presente trabajo se ha realizado una inhibición conjunta de ambas vías para identificar la apoptosis celular en el oído interno habiendo demostrado previamente que la principal efectora de la apoptosis en ototoxicidad por CDDP es la vía intrínseca¹¹⁹.

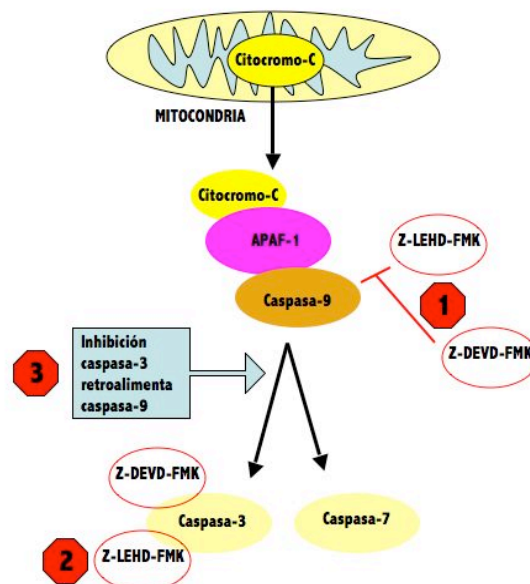


FIGURA 65. CAUSAS DE INHIBICIÓN DE LA CASPASA-9. 1: INHIBICIÓN COMPETITIVA ENTRE Z-DEVD-FMK Y Z-LEHD-FMK POR LA CASPASA-9. 2: INHIBICIÓN DE LA CASPASA-3 POR Z-LEHD-FMK. 3. RETROALIMENTACIÓN DE LA CASPASA-9 POR INHIBICIÓN DE LA CASPASA-3.

3. La detención de la cascada apoptótica en la inhibición selectiva de la caspasa-3 puede tener un efecto de retroalimentación positiva de las caspasas iniciadoras de la vía intrínseca (caspasa-9), mostrando un aumento de su síntesis, sin que ello conlleve un aumento de la capacidad apoptótica, demostrado por el hecho de la conservación de la audición en nuestros animales.

Respecto a los resultados, en el recuento de ATP, parece demostrado que tanto llevar a cabo una apoptosis efectiva inducida por CDDP, como poner en marcha los mecanismos necesarios para la inhibición de la apoptosis mediante inhibidores de caspasas suponen un gasto energético similar. Es decir que el mantenimiento de los niveles auditivos en la rata SD tratada con CDDP más inhibidores de la apoptosis no es debido a un aporte energético extra procedente de la mitocondria, ni a un ahorro de ATP celular, sino a la inhibición selectiva de un paso, probablemente final, de la cascada apoptótica, cuando ya se han generado la mayoría de reacciones consecutivas que culminan con la activación de la caspasa-3.

La inmunofluorescencia muestra como los grupos que han recibido inhibidores de la apoptosis muestran una menor actividad de la caspasa-3 respecto al grupo que sólo recibió CDDP, siendo los resultados más evidentes en la pared lateral del órgano de Corti que en las diferentes poblaciones celulares como las células de soporte y las CCE o las CCI. El mantenimiento de la integridad de la pared lateral junto al mantenimiento de la capacidad auditiva en éstos animales es coherente con una lesión preferencial del CDDP en células distintas a las CCE, y demuestra que salvaguardar las células de soporte y las células de la estría vascular del daño inducido por CDDP puede llevar a evitar la ototoxicidad por CDDP.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo en inhibición de ototoxicidad y apoptosis en el oído interno de rata SD tras tratamiento con CDDP, son una aproximación preliminar a una nueva forma de administración de inhibidores de caspasas. En el momento actual se mantienen abiertas líneas de investigación en este sentido para depurar los resultados obtenidos mediante distintos fármacos

antioxidantes, diversas dosis, y secuencias de administración y con nuevos inhibidores de caspasas para encontrar un tratamiento efectivo contra la lesión tóxica del oído interno que sea trasladable a la práctica clínica. Hasta el momento la inhibición aislada de la caspas-3 está siendo más efectiva que la inhibición aislada de la caspasa-9 mostrando los resultados preliminares (datos no publicados) que la mejor forma de inhibición intraperitoneal de la apoptosis parece ser la centrada en la inhibición de las caspasas apoptóticas.

CONCLUSIONES

1. El Cisplatino administrado en dosis subletales de 5 mg/Kg produce en la rata Sprague-Dawley una pérdida auditiva de carácter neurosensorial, demostrable mediante la realización de potenciales evocados auditivos de tronco cerebral, y constituye un modelo experimental válido para el estudio de la ototoxicidad por agentes platinados.
- 2.- La vía intrínseca de la apoptosis es la responsable de la muerte celular en el oído interno de la rata Sprague-Dawley.
- 3.- La disfunción auditiva provocada por la administración de Cisplatino está en relación con la alteración de la función de las células de soporte y de las células de la pared lateral del órgano de Corti, como paso previo a la apoptosis de las células ciliadas.
- 4.- La proteína de choque térmico-70 es un marcador precoz inespecífico del daño celular en el oído interno del animal de experimentación mediado por el Cisplatino. La regulación de la expresión de esta proteína puede modificar los mecanismos de producción de la apoptosis en el oído interno.
- 5.- La utilización de inhibidores de las caspasas efectoras, administrados por vía sistémica, protege la audición e inhibe la apoptosis de los distintos tipos celulares del oído interno de la rata Sprague-Dawley.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Thomasin JM, Paris J. Stratégie diagnostique devant una surdit  de l'adulte. *Encycl Méd Chir, Oto-Rhino-Laryngologie* 20-181-A-10, 2002, 6p.
- 2.- Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR, Trinidad A, Martín-Marero A, Buján J. Actividad citotóxica coclear del cisplatino en animales de experimentación. Un estudio con microscopía electrónica de barrido. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2002;53:538-42.
- 3.- Encuesta Nacional de Personas con Discapacidad; Instituto Nacional de Estadística. Encuesta INE -CNHD; Diciembre 2000.
- 4.- Biro K, Nozsek L, Prekopp P, Nagyiv nyi K, G czi L, Gaudi I et al. Characteristics and risk factors of cisplatin-induced ototoxicity in testicular cancer patients detected by distortion otoacoustic emission. *Oncology* 2006;70:177-84.
- 5.- Schacht J, Hawkins JE. Sketches of otohistory. Part 11: Drug induced Hearing Loss. *Audiol Neurotol* 2006;11:1-6.
- 6.- M lier F. Expériences et observations sur les propriétés toxiques du sulfate de quinine; mémoire lu à l'Académie royale de Médecine, dans sa séance du 14 de février 1843. *Mém Acad Méd* 1843;10:722-45. Citado por5.
- 7.- Müller G: Beitrag zur Wirkung des salicylsauren Natrons beim Diabetes mellitus. *Berl Klin Wochenschr* 1877;14:29–31. Citado por5.
- 8.- Peyrone M:  ber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlor r. *Ann Chem Pharm* 1845;51:1–29. Citado por5.
- 9.- Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 1969;222:385–6.
- 10.- Kidani Y, Inagaki K, Tsukagoshi S. Examination of antitumor activities of platinum complexes of 1,2-diaminocyclohexane isomers and their related complexes. *Gann* 1976;67:921-2.
- 11.- Calvert AH, Harland SJ, Newell DR, Siddik ZH, Jones AC, McElwain TJ et al. Early clinical studies with cis-diammine-1,1-cyclobutane dicarboxylate platinum II. *Cancer Chemother Pharmacol* 1982;9:140-7.
- 12.- Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 1965;205:698-9.
- 13.- Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:307-20.
- 14.- Boletín Oficial del Estado n  104, de 1 de Mayo de 2001. Real Decreto 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.
- 15.- Alam SA, Ikeda K, Oshima T, Suzuki M, Kawase T, Kikuchi T et al. Cisplatin-induced apoptotic cell death in Mongolian gerbil cochlea. *Hear Res* 2000;141:28–38.
- 16.- Huang T, Cheng AG, Stupak H, Liu W, Kim A, Staecker H et al. Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: otoprotective strategies. *Int J Dev Neurosci* 2000;18:259–70.

- 17.- Nagy JL, Adelstein DJ, Newman CW, Rybicki LA, Rice TW, Lavertu P. Cisplatin ototoxicity: the importance of baseline audiometry. *Am J Clin Oncol* 1999;28:305-8.
- 18.- Bohm S, Oriana S, Spatti G, Di Re F, Breasciani G, Pirovano C et al. Dose intensification of platinum compounds with glutathione protection as induction chemotherapy for advanced ovarian carcinoma. *Oncology* 1999;57:115-20.
- 19.- Kobayashi H, Ohashi N, Watanabe Y, Mizukoshi K. Clinical features of cisplatin vestibulotoxicity and hearing loss. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1987;49:67-72.
- 20.- Moroso MJ, Blair RL. A review of cis-platinum ototoxicity. *J Otolaryngol* 1983;12:365-9.
- 21.- Prim MP, de Diego JI, de Sarriá MJ, Gavilan J. Cambios en el reflejo oculomotor y vestibular en pacientes tratados con cisplatino. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2001;52:367-70.
- 22.- Marco-Algarra J, Basterra J, Marco J. Cis-diaminedichloro platinum ototoxicity. An experimental study. *Acta Otolaryngol* 1985;99:343-7.
- 23.- Laurell G, Bagger-Sjoberg D. Dose-dependent inner ear changes after i. v. administration of cisplatin. *J Otolaryngol* 1991;20:158-67.
- 24.- Laurell G, Engstrom B, Hirsch A, Bagger-Sjoberg D. Ototoxicity of cisplatin. *Int J Androl* 1987;10:359-62.
- 25.- Anniko M, Sobin A. Cisplatin: evaluation of its ototoxic potential. *Am J Otolaryngol* 1986;7:276-93.
- 26.- Watanabe K, Yagi T. Expression of myeloperoxidase in the inner ear of cisplatin-treated guinea pigs. *Anticancer Drugs* 2000;11:727-30.
- 27.- Estrem SA, Babin RW, Ryu JH, Moore KC. Cis-diamminedichloroplatinum (II) ototoxicity in the guinea pig. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1981;89:638-45.
- 28.- Boheim K, Bichler E. Cisplatin-induced ototoxicity: audiometric findings and experimental cochlear pathology. *Arch Otorhinolaryngol* 1985;242:1-6.
- 29.- Kohn S, Fradis M, Pratt H, Zidan J, Podoshin L, Robinson E et al. Cisplatin ototoxicity in guinea pigs with special reference to toxic effects in the stria vascularis. *Laryngoscope* 1988;98:865-71.
- 30.- Tothill P, Klys HS, Matheson LM, McKay K, Smith JF. The long-term retention of platinum in human tissues following the administration of cisplatin and carboplatin for cancer chemotherapy. *Eur J Cancer* 1992;28:1358-61.
- 31.- Stewart DJ, Benjamin RS, Luna M, Feun L, Caprioli R, Seifert W et al. Human tissue distribution of platinum after cis-diamminedichloroplatinum. *Cancer Chemother Pharmacol* 1982;10:51-4.
- 32.- Prospecto del fármaco Platinol-AQ (Cisplatino). Laboratorios Bristol, Princeton, New Jersey 08543 Estados Unidos de América. (Revisado en 1998).
- 33.- Tang X, Hayes II JW, Schroder L, Cacini W, Dorsey J, Elder RC et al. Determination of biotransformation products of platinum drugs in rat and human urine. *Metal-Based Drugs* 1997;4:97-108.
- 34.- Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, recognition and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev* 1999;99:2467-98.
- 35.- Haraguchi H, Matsura H. En: Enomoto S ed. Bitrel, Wako. Saitama. Fujiyoshida. Japón. 2003.

- 36.- Esteban-Fernández D, Verdaguer JM, Ramírez-Camacho R, Palacios MA, Gómez-Gómez MM. Accumulation, fractionation and analysis of platinum in toxicologically affected tissues after cisplatin, oxaliplatin and carboplatin administration. *J Anal Toxicol* 2008;32:140-6.
- 37.- Esteban-Fernández D, Gómez-Gómez MM, Cañas B, Verdaguer JM, Ramírez-Camacho R, Palacios MA. Speciation analysis of platinum antitumoral drugs in impacted tissues. *Talanta* 2007;72:768-73.
- 38.- Hagman D, Goodisman J, Souid AK. Kinetic study on the reactions of platinum drugs with glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:658-66.
- 39.- Hagman D, Goodisman J, Dabrowiak JC, Souid AK. Kinetic study on the reactions of cisplatin with metallothionein. *Drug Metab Dispos* 2003;31:916-23.
- 40.- Ramírez-Camacho R, Fernández DE, Verdaguer JM, Gómez MM, Trinidad A, García-Berrocal JR et al. Cisplatin-induced hearing loss does not correlate with intracellular platinum concentration. *Acta Otolaryngol* 2008;128:505-9.
- 41.- McKeage MJ. Comparative adverse effect profiles of platinum drugs. *Drug Safety* 1995;13:228-44.
- 42.- Gonzalez VM, Fuertes MA, Perez-Alvarez MJ, Cervantes G, Moreno V, Alonso C et al. Induction of apoptosis by the bis-Pt(III) complex [Pt(2)(2-mercaptopyrimidine)(4)Cl(2)]. *Biochem Pharmacol* 2000;60:371-9.
- 43.- Kartalou M, Essigmann JM. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res* 2001;478:1-21.
- 44.- Kopke RD, Liu W, Gabaizadeh R, Jacono A, Feghali J, Spray D et al. Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells. *Am J Otol* 1997;18:559-71.
- 45.- Watanabe K, Hess A, Michel O, Yagi T. Nitric oxide synthase inhibitor reduces the apoptotic change in the cisplatin-treated cochlea of guinea pigs. *Anticancer Drugs* 2000;11:731-5.
- 46.- Watanabe K, Jinnouchi K, Yagi T. Detection of single-stranded DNA (ssDNA) in the vestibule of guinea pigs after the application of cisplatin (CDDP). *Anticancer Res* 2001;21:1135-8.
- 47.- Pardo FJ. Agentes y mecanismos de lesión celular. Necrosis. En: Pardo FJ ed. *Anatomía Patológica*. Mosby. Madrid. España. 1997.
- 48.- Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome C during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature Cell Biol* 2000;2:156-62.
- 49.- Harris MH, Thompson CB. The role of Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ* 2000;7:1182-91.
- 50.- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of Bid by caspase 8 mediated the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501.
- 51.- Dawson VL, Dawson TM. Free radicals and neuronal cell death. *Cell Death Differ* 1996;3:71-8.
- 52.- Lewén A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 2000;17:871-90.
- 53.- Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 2001;26:61-6.

- 54.- Gillardon F, Lenz C, Waschke KF, Krajewski S, Reed JC, Zimmermann M et al. Altered expression of Bcl-2, Bcl-X, Bax, and c-Fos colocalizes with DNA fragmentation and ischemic cell damage following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1996;40:254-60.
- 55.- Benchoua A, Guégan C, Couriaud C, Hosseini H, Sampaio N, Morin D, Onténiente B. Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci* 2001;21:7127-34.
- 56.- Cao G, Luo Y, Nagayama T, Pei W, Stetler RA, Graham SH, Chen J. Cloning and characterization of rat caspase-9: implications for a role in mediating caspase-3 activation and hippocampal cell death after transient cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:534-46.
- 57.- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:17907-11.
- 58.- Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002;9:459-70.
- 59.- Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999;6:1067-74.
- 60.- Yakovlev AG, Faden AI. Caspase-dependent apoptotic pathways in CNS injury. *Mol Neurobiol* 2001;24:131-44.
- 61.- Ray SK. Currently evaluated calpain and caspase inhibitors for neuroprotection in experimental brain ischemia. *Curr Med Chem* 2006;13:3425-40.
- 62.- Schotte P, Declercq W, Van Huffel S, Vandenabeele P, Beyaert R. Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *FEBS Lett* 1999;442:117-21.
- 63.- Rozman-Pungercar J, Kopitar-Jerala N, Bogyo M, Turk D, Vasiljeva O, Stefe I et al. Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by caspase-specific inhibitors: when reaction mechanism is more important than specificity. *Cell Death Differ* 2003;10:881-8.
- 64.- Harris JP, Sharp PA. Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1990;100:516-24.
- 65.- Billing PB, Keithley EM, Harris JP. Evidence linking the 68 kilodalton antigen identified in progressive sensorineural hearing loss patient sera with heat shock protein 70. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:181-8.
- 66.- Oh SH, Yu WSY, Song B-H, Lim D, Koo J-W, Chang SO et al. Expression of heat shock protein 72 in rat cochlea with cisplatin-induced acute ototoxicity. *Acta Otolaryngol* 2000;120:146-50.
- 67.- Ramírez-Camacho R, Citores MJ, Trinidad A, Verdager JM, García-Berrocal JR, Marero AM et al. HSP-70 as a nonspecific early marker in cisplatin ototoxicity. *Acta Otolaryngol*. 2007;127:564-7.
- 68.- Zuur CL, Simis YJ, Lansdaal PE, Hart AA, Schornagel JH, Dreschler WA et al. Ototoxicity in a randomized phase III trial of intra-arterial compared with intravenous cisplatin chemoradiation in patients with locally advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:3759-65.

- 69.- Ress BD, Sridhar KS, Balkany TJ, Waxman GM, Stagner BB, Lonsbury-Martin BL. Effects of cis-platinum chemotherapy on otoacoustic emissions: the development of an objective screening protocol. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;121:693-701.
- 70.- Stavroulaki P, Apostolopoulos N, Segas J, Tsakanikos M, Adamopoulos G. Evoked otoacoustic emissions: an approach for monitoring cisplatin induced ototoxicity in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2001;59:47-57.
- 71.- Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF. Special Report: The 1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *ILAR J* 1997;38:41-8.
- 72.- Boletín Oficial del Estado nº 252, 21 de octubre de 2005, pag. 34367-91 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.
- 73.- Boletín Oficial del Estado nº 268, 8 de Noviembre 2007, pag. 45914-20 para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
- 74.- Jero J, Coling DE, Lalwani AK. The use of Preyer's reflex in evaluation of hearing in mice. *Acta Otolaryngol* 2001;121:585-9.
- 75.- Verdaguer JM, Trinidad A, González-García JA, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Spontaneous otitis media in Wistar rats: an overlooked pathology in otological research. *Lab Anim (NY)* 2006;35:40-4.
- 76.- Hatzopoulos S, Petruccielli J, Laurell G, Prevati M, Martini A. Electrophysiological findings in the Sprague-Dawley rat induced by moderate-dose carboplatin. *Hear Res* 2003;182:48-55.
- 77.- Peiró C, Matesanz N, Nevado J, Lafuente N, Cercas E, Azcutia V et al. Glycosylated human oxyhaemoglobin activates nuclear factor-kappaB and activator protein-1 in cultured human aortic smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2003;140:681-90.
- 78.- Nevado J, Sanz R, Casqueiro JC, Ayala A, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Ageing evokes an intrinsic pro-apoptotic signalling pathway in rat's cochleae. *Acta Otolaryngol* 2006;126:1134-9.
- 79.- Thornberry NA, Chapman KT, Nicholson DW. Determination of caspase specificities using a peptide combinatorial library. *Meth Enzymol* 2000;322:100-10.
- 80.- Barres BA. New roles for glia. *J Neurosci* 1991;11:3685-94.
- 81.- Spicer SS, Schulte BA. Spiral ligament pathology in quiet-aged gerbils. *Hear Res* 2002;172:172-85.
- 82.- Vater M, Lenoir M, Pujol R. Development of the organ of Corti in horseshoe bats: scanning and transmission electron microscopy. *J Comp Neurol* 1997;377:520-34.
- 83.- Spicer SS, Schulte BA. Cytologic structures unique to Deiters cells of the cochlea. *Anat Rec* 1993;237:421-30.
- 84.- Thalmann R, Henzl MT, Thalmann I. Specific proteins of the organ of Corti. *Acta Otolaryngol* 1997;117:265-8.
- 85.- Kikuguchi T, Kimura RS, Paul DP, Adams JC. Gap junctions in the rat cochlea. Immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol* 1995;191:101-18.
- 86.- Thalmann R, Henzl MT, Killick R, Ignatova EG, Thalmann I. Towards an understanding of cochlear hemostasis: the impact of location and the role of OCP1 and OCP2. *Acta Otolaryngol* 2003;123:203-8.

- 87.- Kruger RP, Goodyear RJ, Legan PK, Wharchol ME, Raphael Y, Cotanche DA et al. The supporting cell antigen: a receptor like protein tyrosine phosphatase expressed in the sensory epithelia of the avian inner ear. *J Neurosci* 1999;19:4815-27.
- 88.- Lunardi C, Basor C, Leandir M, Navone R, Lestani M, Millo E et al. Autoantibodies to inner ear and endothelial antigens in Cogan's syndrome. *Lancet* 2002;360:915-2.
- 89.- Shimazaki T, Ichimiya I, Suzuki M, Mogi G. Localization of glucocorticoid receptors in the murine inner ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002;111:1133-8.
- 90.- Schweitzer VG. Ototoxicity of chemotherapeutic agents. *Otolaryngol Clin North Am* 1993;26:759-89.
- 91.- Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR, Buján J, Martín-Marero A, Trinidad A. Supporting cells as a target of cisplatin-induced inner ear damage: therapeutic implications. *Laryngoscope* 2004;114:533-7.
- 92.- Löwerheim H, Furness DN, Kil J, Zinn C, Gültig K, Fero ML et al. Gene disruption of p27(Kip 1) allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of Corti. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4084-8.
- 93.- Martínez Monedero R. Tesis Doctoral. Células madre en el oído interno: trasplante celular en el órgano de Corti. 2007.
- 94.- Storch JM, García T. Dictionary for chemical engineers and chemical process industries and connected fields. Díaz de Santos. Madrid. 2007.
- 95.- Igea JM, Mugüerza P, Lázaro M. Manual de estilo del alergólogo III, los extranjerismos. *Alergol Inmunol Clin* 2001;16: 298-300.
- 96.- Esteban Fernández D. Tesis Doctoral. Desarrollo de métodos analíticos basados en técnicas cromatográficas y espectrometría de masas para estudios de metalómica de fármacos antitumorales de Pt en muestras biológicas. 2008.
- 97.- Bokemeyer C, Berger CC, Hartmann JT, Kollmannsberger C, Schmoll HJ, Kuczyk MA et al. Analysis of risk factors of cisplatin induced ototoxicity in patients with testicular cancer. *Br J Cancer* 1998;77:1355-62.
- 98.- Biro K, Nozsek L, Prekopp P, Nagyiványi K, Gécz L, Gaudi I et al. Characteristics and risk factors of cisplatin-induced ototoxicity in testicular cancer patients detected by distortion otoacoustic emission. *Oncology* 2006;70:177-84.
- 99.- Knight KR, Kraemer DF, Winter C, Neuwelt EA. Early changes in auditory function as a result of platinum chemotherapy: use of extended high-frequency audiometry and evoked distortion product otoacoustic emissions. *J Clin Oncol* 2007;25:1190-95.
- 100.- Kushner BH, Budnick A, Kramer K, Modak S, Cheung NK. Ototoxicity from high-dose use of platinum compounds in patients with neuroblastoma. *Cancer* 2006;107:417-22.
- 101.- Ravi R, Somani SM, Rybak LP. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant defense system. *Pharmacol Toxicol* 1995;76:386-94.
- 102.- Van Ruijven MW, de Groot JC, Hendriksen F, Smoorenburg G. Immunohistochemical localization of platinumated DNA in the cochlea of cisplatin-treated guinea pigs. *Hear Res* 2005;203:112-21.

- 103.- Alam SA, Ikeda K, Oshima T, Suzuki M, Kawase T, Kikuchi T et al. Cisplatin-induced apoptotic cell death in Mongolian gerbil cochlea. *Hear Res* 2000;141:28-38
- 104.- Rybak LP, Husain K, Morris C, Whitworth C, Somani S. Effect of protective agents against cisplatin ototoxicity. *Am J Otol* 2000;21:513-20.
- 105.- Chen WC, Jackson A, Budnick A, Pfister DG, Kraus DH, Hunt M et al. Sensorineural hearing loss in combined modality treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 2006;106:820-9.
- 106.- Li Y, Womer RB, Silber JH. Predicting cisplatin ototoxicity in children: influence of age and the cumulative dose. *Eur J Cancer* 2004;40:2445-51.
- 107.- Peters U, Preisler-Adams S, Lanvers-Kaminski C, Jürgens H, Lamprecht-Dinessen A. Sequence variations of mitochondrial DNA and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Anticancer Res* 2003;23:1249-55.
- 108.- Riedemann L, Lanvers C, Deuster D, Peters U, Boos J, Jürgens H et al. Megalin genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Pharmacogenomics J* 2008;8:23-8.
- 109.- Oldenburg J, Kraggerud SM, Cvancarova M, Lothe RA, Fossa SD. Cisplatin-induced long-term hearing impairment is associated with specific glutathione-S-transferase genotypes in testicular cancer survivors. *J Clin Oncol* 2007;25:708-14.
- 110.- García-Berrocal JR. Tesis Doctoral. Estudio de la patología inmunoinducida en el oído interno. 1996.
- 111.- Meech RP, Campbell KC, Hughes LF, Rybak LP. A semiquantitative analysis of the effects of cisplatin on the rat stria vascularis. *Hear Res* 1998;124:44–59.
- 112.- Husain K, Scott RB, Whitworth C, Somani SM, Rybak LP. Dose response of carboplatin-induced hearing loss in rat. *Hear Res* 2001;151: 71-8.
- 113.- Sluyter S, Klis SF, de Groot JC, Smoorenburg, G. Alterations in the stria vascularis in relation to cisplatin ototoxicity and recovery. *Hear Res* 2003;185:49–56.
- 114.- Lee JE, Nakagawa T, Kita T, Endo T, Shiga A, Iguchi F et al. Role of reactive radicals in degeneration of the auditory system of mice following cisplatin treatment. *Acta Otolaryngol* 2004;124:1131-35.
- 115.- Liang F, Schulte Ba, Qu C, Hu W, Shen Z. Inhibition of the calcium and voltage dependent big conductance potassium channel ameliorates cisplatin-induced apoptosis in spiral ligament fibrocytes of the cochlea. *Neuroscience* 2005;135:263-71.
- 116.- Bauer CA, Brozoski TJ. Cochlear structure and function after round window application of ototoxins. *Hear Res* 2005;201:121-31.
- 117.- Thomas JP, Lautermann J, Liedert B, Seiler F, Thomale J. High accumulation of platinum–DNA adducts in strial marginal cells of the cochlea is an early event in cisplatin but not carboplatin ototoxicity. *Mol Pharm* 2006;70:23–29.
- 118.- So H, Kim H, Lee JH, Park C, Kim Y, Kim E et al. Cisplatin cytotoxicity of auditory cells requires secretions of proinflammatory cytokines via activation of ERK and NF-kappaB. *J Assoc Res Otolaryngol* 2007;112:32-9.

- 119.- García-Berrocal JR, Nevado J, Ramírez-Camacho R, Sanz R, González-García JA, Sánchez-Rodríguez C et al. The anticancer drug cisplatin induces an intrinsic apoptotic pathway inside the inner ear. *Br J Pharmacol* 2007;152:1012-20.
- 120.- Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjea D, Ramkumar V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hear Res* 2007;226:157-67.
- 121.- Van Ruyven MW, de Groot JC, Klis SF, Smoorenburg G. Cochlear targets of cisplatin: an electrophysiological and morphological time-sequence study. *Hear Res* 2005;205:241-8.
- 122.- Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR, Trinidad A, González-García JA, Verdaguer JM, Ibáñez A et al. Central role of supporting cells in cochlear homeostasis and pathology. *Med Hypotheses* 2006;67:550-5.
- 123.- Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR, Trinidad A, Verdaguer JM, Nevado J. Blebs in inner and outer hair cells: a pathophysiological hypothesis. *J Laryngol Otol* 2008. Epub 10 de enero de 2008.
- 124.- Cheng PW, Liu SH, Hsu CJ, Lin-Shiau SY. Correlation of increased activities of Na⁺, K⁺ ATPase and Ca²⁺ ATPase with the reversal of cisplatin ototoxicity induced by D-methionine in guinea pigs. *Hear Res* 2005;205:102-9.
- 125.- García-Berrocal JR, Méndez-Beneggasi I, Martín C, Ramírez-Camacho C. Intervención de los fibrocitos del ligamento espiral en la regulación metabólica del oído interno. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2008. (en prensa).
- 126.- Banfi B, Makgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. Nox3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem* 2004;279:46065-72.
- 127.- Wang J, Ladrech S, Pujol R, Brabet P, Van de Water TR, Puel JL. Caspase inhibitors but not C-Jun NH2-terminal kinase inhibitor treatment, prevent cisplatin-induced hearing loss. *Cancer Res* 2004;64:9217-24.
- 128.- Cunningham L, Brandon CS. Heat shock inhibits both aminoglycoside and cisplatin-induced sensory cell death. *J Assoc Res Otolaryngol* 2006;7:299-307.
- 129.- Ramírez-Camacho R, Citores MJ, Trinidad A, Verdaguer JM, García-Berrocal JR, Marero AM et al. HSP-70 as a nonspecific early marker in cisplatin ototoxicity. *Acta Otolaryngol* 2007;127:564-7.
- 130.- Whitworth CA, Ramkumar V, Jones B, Tsukanaki N, Rybak LP. Protection against cisplatin ototoxicity by adenosine agonists. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1801-7.
- 131.- Rybak LP. Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;15:364-9.
- 132.- Mukherjea D, Whitworth CA, Nandish S, Dunaway GA, Rybak LP, Ramkumar V. Expression of the kidney injury molecule 1 in the rat cochlea and induction by cisplatin. *Neuroscience* 2006;139:733-40.
- 133.- Ekborn A, Lindberg A, Laurell G, Wallin I, Eksborg S, Ehrsson H. Ototoxicity, nephrotoxicity and pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in the guinea pig. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;51:36-42.
- 134.- Wang J, Lloyd Faulconbridge RV, Fetoni A, Guitton MJ, Pujol R, Puel JL. Local application of sodium thiosulphate prevents cisplatin-induced hearing loss in the guinea pig. *Neuropharmacology* 2003;45:380-93.
- 135.- Bowers WJ, Chen X, Guo H, Frisina DR, Federoff HJ, Frisina RD. Neurotrophin-3 transduction attenuates cisplatin spiral ganglion neuron ototoxicity in the cochlea. *Mol Ther* 2002;6:12-8.

- 136.- Church MW, Blakley BW, Burgio DL, Gupta AK. WR-2721 (Amifostine) ameliorates cisplatin-induced hearing loss but causes neurotoxicity in hamsters: dose-dependent effects. *J Assoc Res Otolaryngol* 2004;5:227-37.
- 137.- Korver KD, Rybak LP, Whitworth C, Campbell KM. Round window application of D-methionine provides complete cisplatin otoprotection. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;126:683-9.
- 138.- Ford MS, Nie Z, Whitworth C, Rybak LP, Ramkumar V. Up-regulation of adenosine receptors in the cochlea by cisplatin. *Hear Res* 1997;111:143-52.
- 139.- Nie Z, Mei Y, Ford M, Rybak L, Marcuzzi A, Ren H et al. Oxidative stress increases A1 adenosine receptor expression by activating nuclear factor kappa B. *Mol Pharmacol* 1998;53:663-9.
- 140.- So HS, Park C, Kim HJ, Lee JH, Park SY, Lee JH et al. Protective effect of T-type calcium channel blocker flunarizine on cisplatin-induced death of auditory cells. *Hear Res* 2005;204:127-39.
- 141.- Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997;388:300-4.
- 142.- Chen X, Frisina RD, Bowers WJ, Frisina DR, Federoff HJ. HSV amplicon-mediated neurotrophin-3 expression protects murine spiral ganglion neurons from cisplatin-induced damage. *Mol Ther* 2001;3:958-63.
- 143.- Zhang M, Liu W, Ding D, Salvi R. Pifithrin-alpha suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis. *Neuroscience* 2003;120:191-205.
- 144.- Li G, Sha SH, Zotova E, Arezzo J, Van de Water T, Schacht J. Salicylate protects hearing and kidney function from cisplatin toxicity without compromising its oncolytic action. *Lab Invest* 2002;82:585-96.
- 145.- Rybak LP, Kelly T. Ototoxicity: bioprotective mechanisms. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;11:328-33.
- 146.- Lee JE, Nagakawa T, Kita T, Kim TS, Iguchi F, Endo T et al. Mechanisms of apoptosis induced by cisplatin in marginal cells in mouse stria vascularis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2004;66:111-8.
- 147.- Devarajan P, Savoca M, Castaneda MP, Park MS, Esteban-Cruciani N, Kalinec G et al. Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: role of death receptor and mitochondrial pathways. *Hear Res* 2002;174:45-54.
- 148.- Cardinaal RM, De Groot JC, Huizing EH, Smoorenburg GF, Veldman JE. Ultrastructural changes in the albino guinea pig cochlea at different survival times following cessation of 8-day cisplatin administration. *Acta Otolaryngol* 2004;124:144-54.
- 149.- Rybak LP, Husain K, Whitworth C, Somani SM. Dose dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats: antioxidant defense system. *Toxicol Sciences* 1999;47:195-02.
- 150.- Evans P, Halliwell B. Free radicals and hearing. Cause, consequence and criteria. *Ann NY Acad Sci* 1999;884:19-40.
- 151.- Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs necrosis. *Am J Physiol* 1996;270:700-8.
- 152.- Watanabe K, Jinnouchi K, Hess A, Michel O, Baba S, Yagi T. Carboplatin induces less apoptosis in the cochlea of guinea pigs than cisplatin. *Chemotherapy* 2002;48:82-7.

- 153.- Cardinaal RM, De Groot JC, Huizing EH, Veldman JE, Smoorenburg GF. Cisplatin-induced ototoxicity: morphological evidence of spontaneous outer hair cell recovery in albino guinea pigs? *Hear Res* 2000;144:147-56.
- 154.- Harris JP, Sharp PA. Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1990;100:516-24.
- 155.- Lim HH, Jenkins OH, Myers MW, Miller JM, Altschuler RA. Detection of HSP 72 synthesis after acoustic overstimulation in rat cochlea. *Hear Res* 1993;104:181-8.
- 156.- Myers MW, Quirk WS, Rizk SS, Miller JM, Altschuler RA. Expression of the major mammalian stress protein in the rat cochlea following transient ischemia. *Laryngoscope* 1992;102:981-7.
- 157.- Gower VC, Thompson AM. Localization of inducible heat shock protein mRNA in the guinea pig cochlea with a nonradioactive in situ hybridization technique. *Laryngoscope* 1997;107:228-32.
- 158.- Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2004;101:227-57.
- 159.- Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, Dhaulakhandi D, Sharif R, Dawra R et al. Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2007;67:616-25.
- 160.- Mizutani K, Matsunaga T, Kamiya K, Fujinami Y, Fujii M, Ogawa K. Caspase inhibitor facilitates recovery of hearing by protecting the cochlear lateral wall from acute cochlear mitochondrial dysfunction. *J Neurosci Res* 2008;86:215-22.
- 161.- Berger AB, Sexton KB, Bogoy M. Commonly used caspase inhibitors designed based on substrate specificity profiles lack sensitivity. *Cell Res* 2006;16:961-3

ANEXO I

Central role of supporting cells in cochlear homeostasis and pathology.

Medical Hypotheses 2006;67:550-5.

Medical Hypotheses (2006) 67, 550–555

medical
hypotheses<http://intl.elsevierhealth.com/journals/mehy>

Central role of supporting cells in cochlear homeostasis and pathology

R. Ramírez-Camacho ^a, J.R. García-Berrocal ^a, A. Trinidad ^{a,*},
J.A. González-García ^a, J.M. Verdaguer ^b, A. Ibáñez ^a, A. Rodríguez ^a,
R. Sanz ^c

^a Ear Research Group, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Universidad Autónoma de Madrid, San Martín de Porres 4, 28035 Madrid, Spain

^b Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

^c Hospital Universitario de Getafe, Universidad Carlos III, Spain

Received 15 February 2006; accepted 20 February 2006

Summary

Hypothesis: Supporting cells have a crucial role in degenerative and regenerative events of primary sensorial hair cells of the organ of Corti. This new role should determine future studies about pathophysiology of hearing loss and its regenerative treatment.

Supporting evidence: Recent findings suggest an active role of supporting cells in the maintenance of hair cell function and structure. Evidences of high energy consumption and close proximity to auditory nervous fibers suggesting K⁺ active exchange, preferential expression of specific proteins and antigens, presence of glucocorticoids receptors, affinity for cisplatin and regenerative potential give the supporting cells an important role in homeostasis of the organ of Corti and in some specific diseases affecting this structure.

Conclusion: As well as glial cells provide protection and regeneration to neural tissues, supporting cells may provide the necessary metabolic and electrolytic conditions for hair cells mechanical and bioelectrical function. This opens new possibilities for the treatment of apparently "irreversible" destruction of the inner ear.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Sensorineural hearing loss and vestibular disorders are common handicaps in developed societies. As the population ages, cochleo-vestibular disorders

are expected to increase. Additionally, exposition to noise, infections and ototoxic drugs result in an increase of hearing loss in population, and consequently of the sanitary expending.

Research on sensorineural hearing loss has traditionally focused on the hair cells. As they are the first station in the conversion of sound into electrical signals that are conducted by the axons of spiral ganglion neurons to the brain, they have been

* Corresponding author. Tel.: +34 1 3445409; fax +34 1 3730535.

E-mail address: atrinidad@yahoo.es (A. Trinidad).

considered the primary target for harmful agents. However, recent studies discussed below have demonstrated functional properties of the supporting cells suggesting that these cells may play a more important role in the organ of Corti functioning than it was believed until now.

Hypothesis

Recent and recurrent evidences about the structure and functioning of the supporting cells have changed the conceptions about pathophysiology of the organ of Corti. Supporting cells have a crucial role in degenerative and regenerative events of primary sensorial hair cells that may be applied in future treatments of inner ear pathology.

Empirical data

Recent studies have shown the value of supporting cells in homeostasis of the organ of Corti and in some specific diseases affecting this structure (Table 1).

Supporting cells ultrastructure: metabolic implications in hair cell homeostasis

The hair cells are supported in a rigid framework of supporting cells that include the inner border cells, the inner phalangeal cells, the inner and outer pillar cells, Deiter's cells, Hensen cells, Claudius cells, outer sulcus cells and Boettcher cells. The main structural support for the organ of Corti is provided by the pillar cells and Deiter's cells. They have a specialized system of endocellular protein filaments which provides them with internal support. Long laminar processes extend from the pillar heads and join together with processes of Deiter's cells and the cuticles of the hair cells to form the reticular lamina [1](Fig. 1).

Deiter's cells form three parallel rows in the cochlea of most mammals. Each cell rests on the basilar membrane and bears on its apical cup-shaped surface an outer hair cell. They possess an unusual rod-like cytoskeletal element which stands on the basal plasmalemma and reaches into the apical cytoplasm [2,3]. The cytoskeletal structure consists of microtubules with interspersed microfilaments composed of actin referred as the microtubule stalk [4].

The medial plasmalemma of Deiter's cells envelops nerves and the cup-shaped apical plasmalemma closely contacts the basal plasma membrane of the overlying outer hair cell or nerves synapsing thereon. The closed association of Deiter's cell plasma-

Table 1 Role of supporting (Deiter's) cells in inner ear disorders

Hair cell homeostasis	Genetic deafness	Autoimmune inner ear disease	Cisplatin ototoxicity	Hair cell regeneration
Apical compartment of cell with many mitochondria and creatine kinase	Presence of Organ of Corti specific proteins: OCP1 and OCP2 (target for connexin 26 protein)	Cogan peptide KHRI-3 antigen (target) Glucocorticoid receptor	Proteins of same molecular weight as OCP1 and OCP2 Accumulation of cisplatin in Deiter's cells	Expression of 27 Kip1 gene
Closed association of plasmalemma with OHC and nerves K ⁺ efflux and buffering K ⁺ fluctuation (glia-like activity)	Removal of K ⁺ excess			
OHC = outer hair cell; OCP = Organ of Corti Proteins.				

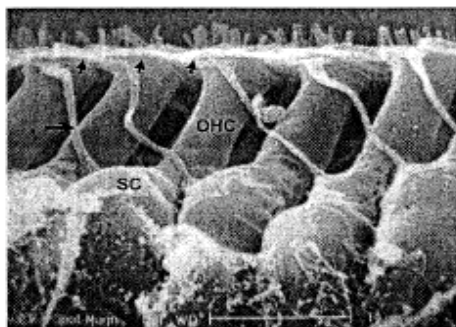


Figure 1 Scanning electron micrograph showing a lateral view of the external row of outer hair cells and supporting (Deiter's) cells with their cuticular prolongations (open arrow). Reticular lamina (short arrows). OHC — outer hair cells; SC — supporting cells.

lemma with nerves has suggested a possible role for these cells analogous to that of glia in directing K^+ efflux from nerves and buffering K^+ fluctuation [5], supported by the notable extension of dense trabeculae to plasmalemma enveloping nerves and plasma membrane bordering outer hair cells.

Lying close to apical plasmalemma, the tubular reticulum in Deiter's cells appears to be situated to facilitate K^+ resorption from lateral Nuel's space and serve as an ion reservoir, or to mediate ion diffusion down a gradient toward the scala tympani, thereby mediating the salvaging of K^+ and avoiding its accumulation in outer tunnel to a level cytotoxic to the hair cells [6].

The striking structural differences between apical and basal regions of Deiter's cells probably due to vimentin, which has a known effect on intracellular organization of organelles, reflect functional variability. The basal compartment consisting almost entirely of an amorphous cytosol with a microtubule stalk perhaps has mainly a mechanical function for transmission or absorption of mechanical energy, in a passive as well as an active mechanical processing of frequency, since it is through this interface that mechanical vibration is transferred between basilar membrane and outer hair cells [7].

Abundance of mitochondria apically attests to high metabolism in this part of the Deiter's cells, supporting the implication for active energy utilization derived from the demonstration of a high level of creatine kinase [4].

This apparently active energy consumption points to a biologic role for Deiter's cells, mainly the apical region, that functions in consort with the adjacent outer hair cell and the numerous

nerve fibers enveloped by the Deiter's cells plasmalemma, resorbing ions, particularly K^+ , that efflux from the adjacent hair cell and nerves.

Moreover, the dispersion of nuclear chromatin could signify a higher rate of transcription and protein turnover in Deiter's cells compared with outer hair cells.

Specific proteins of the organ of Corti OCP1 y OCP2

The overall cellular metabolism comprises coordinated activities of thousand of proteins. Many of these are common to all cells and tissues. However, those physiological activities unique to specialized cells, like those of the organ of Corti, are conferred by a very limited subset of proteins. These specific proteins are candidates for organ-specific dysfunctions and are of great potential medical significance. OCP1 and OCP2 are preferentially expressed in the auditory system [8].

Immunohistochemical studies have revealed strong staining in the supporting cells of the organ of Corti and adjacent epithelia, but not in the hair cells. Significantly, this distribution coincides with the boundaries of the epithelial gap junction system of the cochlea, as defined by staining for connexin 26 [9]. These proteins are diffusely distributed within the cytoplasm of the supporting cells, but is absent from the nucleus.

Since the supporting cell population express high levels of OCP1 and OCP2, now known to be components of a novel, organ of Corti-specific SCF ubiquitin ligase, connexins may be the target proteins for this ligase [10].

As the regulatory center of the cochlea, the supporting cell population must continuously process chemical and neural input and respond rapidly to departures from homeostasis. The linkage between connexin mutations and the pathogenesis of non-syndromic hereditary deafness has increased the interest in the epithelial gap-junction system [10].

The cochlear gap junction system may assist with removal of the excess K^+ from the hair cells and with its recirculation via the spiral ligament by the stria vascularis. The endolymphatic potential also perturbs the acid/base equilibrium, necessitating continuous acidification of the endolymph. The presence of an acidification system in cells bordering the scala media parallels that of OCP that may participate in pH homeostatic mechanisms.

Autoantibodies and supporting cells

Autoimmunity is thought to be one of the causes of sensorineural hearing loss. Immunomediated

reaction occurs primarily in the stria vascularis and the spiral ligament. Inflammatory response within the cochlea can lead to the formation of a fibro-osseous tissue that destroys the entire organ of Corti and leads to nonreversible hearing loss. Cochleas with severe inflammation have shown endolymphatic hydrops, degenerative changes in the organ of Corti, stria vascularis, and the spiral ganglion cells, as well as a marked increase in the number of inflammatory cells in the human endolymphatic sac, and the presence of granulomatous lesions with PMNs and macrophages [11].

Screening of a random peptides library was performed in order to identify disease-relevant autoantigen peptides. It identified an immunodominant peptide that was similar to the cell-density enhanced protein tyrosine phosphatase-1, which is expressed on the supporting cells in the sera of patients with Cogan's syndrome [12].

On the other hand, antibodies against the Cogan peptide, which are highly expressed on supporting cells of the inner ear [12], have been shown to specifically recognize a synthetic peptide corresponding to the connexin 26 sequence. The same antibodies bound connexin 26 gene mutation, which is related to the frequent congenital inner ear non-syndromic deafness [13].

Patients with suspected autoimmune sensorineural hearing loss have antibodies to 68–72 kDa protein and to inner ear supporting cells that are similar to the KHRI-3 hybridoma antibody. Furthermore, serum with antibody to inner ear supporting cells also identify a 68–70 kDa protein immunoprecipitated from guinea pig inner ear extracts by the KHRI-3 antibody, suggesting that the KHRI-3 monoclonal antibody and human antibodies recognize the same inner ear supporting cell antigen (choline transporter-like protein 2).

Additionally, glucocorticoid receptors are expressed in type III fibrocytes of the spiral ligament, and in the neighbouring cochlear supporting cells, but not in the hair cells [14]. This finding suggests that when clinicians prescribe corticosteroids for the treatment of patients with sudden and immunomediated sensorineural hearing loss, the target of this therapy is the supporting cell and not the hair cell [15].

Supporting cells and ototoxicity induced by platinated drugs

Cisplatin is an antitumoral drug with a well-known ototoxic effect occurring in an average of 36% of patients [16]. Subject-related factors can explain the differences between the published series. It is generally accepted that cisplatin exerts its ac-

tion within the first 12 h after administration and spontaneous recovery of hearing has been described. This is the reason why most of the studies previously published have been performed shortly after the cytotoxic action. However, hearing tests performed in the short, middle and long term after the administration of a single dose of 5 mg/kg of cisplatin in the rat have shown an increase of hearing thresholds that is higher at 120 days after the injection, which is in contradiction with the common believing that hair cell damage occurs shortly after the injury. These findings suggest that there may exist an intermediate structure that controls the functioning of the hair cell, such as the supporting cells (Deiter's cells), that has an influence in the chronology of sensory cell damage [17].

Although cisplatin mainly affects outer hair cells [18], limited alterations (vacuolization, augmentation of lysosomes, smaller mitochondria) without degeneration have been found in the inner ear cells in chronic treatment [19]. Most refined immunohistochemical methods are able to detect cisplatin in the nuclei of most cells in the organ of Corti and the lateral wall, especially in the outer hair cells and the spiral ligament fibrocytes, whereas the nuclei of supporting cells are only weakly stained [20]. The findings of Cisplatin traces on the nuclei of supporting cells correlate with morphological and molecular evidences [21,22].

Cisplatin uptake is markedly higher in cochlea than in brain [16]. Electrophoresis of cochlear tissues has shown higher quantities of platinum in proteins with a molecular weight similar to organ of Corti's specific proteins (OCP) (Palacios MA et al., unpublished data), OCP1, OCP2 [10] and oncomodulin [23]. OCPs are present mainly in the supporting cells, what suggests a new pathophysiological pathway for cisplatin-induced damage.

Supporting cells and sensory epithelia regeneration

It is universally accepted that the loss of postmitotic cells such as hair cells of the organ of Corti causes irreversible hearing loss without spontaneous regeneration in mammals. In birds, amphibians and fishes, regeneration of sensory hair cells through asymmetric divisions of supporting cells can contribute to recovery of hearing after brain cells loss secondary to several trauma [24]. In contrast with the absence of any proliferative capacity in mammals organ of Corti, the supporting cells of the avian auditory epithelium exist in a quiescent state and have retained its proliferative capacity in response to hair cell loss [25].

Potential precursors for regenerating hair cells (including hair cells that de-differentiate and re-enter the mytotic cycle) would be stem cells located outside the sensory epithelium, and sensory epithelial supporting cells [26].

3 H-thymidine labeled hair and supporting cells were observed after intensive sound exposition in the region of sensory damage in neonatal chicks [24]. In other study, hair cells counts revealed that 70% hair cell loss observed 10 days after acoustic trauma were nearly fully recovered by 60 days after the trauma in adult quails [27]. Concomitant with the hair cells recovery, the tectorial membrane also regenerated [28]. Cochlear supporting cells secrete new matrix materials to regenerate the honeycomb-like lower layer of the tectorial membrane [26].

Studies in mouse demonstrated that different treated mammals hair cells can continue to cycle and divide in the absence of the retinoblastoma protein, so that functional hair cells can be regenerated through division of preexisting hair cells [29]. Investigation has been directed at the potential role of cell-cycle inhibition in the supporting cell mediated by the cyclin-dependant kinase inhibitors, with function in both cell-cycle arrest and differentiation in other cell types [25]. Cyclin-dependant kinase complexes have been implicated in maintaining cells in a terminally differentiated stage. Expression of 27 Kip 1, one of the Cip/Kip-family, confined in the supporting cells, support the existence of a cell-selective regulator of cell proliferation leading to the formation of the precise tissue architecture. Release from inhibition obtained by 27 Kip 1-gene disruption may provide a means by which proliferation-based hair cell regeneration may be initiated [25].

Neural stem cells have been grafted into newborn rat cochleas [30]. Surviving hair cells were widely distributed in the cochlear cavity and adopted morphologically appropriate phenotypes for their final location.

Further development of a method for differentiation of non-sensory cells to hair cells would be an effective way for achieving a topographic regeneration of sensory epithelium of the organ of Corti at the expense of residual cells after damage.

Conclusion

Development of radically new concepts about organ of Corti has conferred the supporting cells, specially the Delter's cells, great importance. As well as glial cells provide protection and regeneration to neural tissues, supporting cells could represent an intermediate station that provides the necessary metabolic

and electrolytic conditions for hair cells to transform mechanic energy into bioelectric energy.

In contrast to the traditional fatalism about inner ear diseases, this hypothesis opens new possibilities for the treatment of apparently "irreversible" conditions. Further research is needed to achieve a more precise knowledge about the role of supporting and hair cells and to develop specific therapies for the cure and prevention of the organ de Corti damage.

Acknowledgement

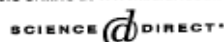
Supported by Spanish Research Found (FIS) grant PI 050673.

References

- [1] Neely JG, Dennis JM, Lippe WR. Anatomy of the auditory end organ and neural pathways. In: Cummings CW, editor. Otolaryngology — head and neck surgery. St. Louis: The CV Mosby Company; 1986. p. 2609–32.
- [2] Engström H, Wersäll J. Structure and innervation of the inner ear sensory epithelium. *Int Rev Cytol* 1958;7:535–85.
- [3] Kimura RS. Ultrastructure of the organ of Corti. *Int Rev Cytol* 1975;42:173–222.
- [4] Spicer SS, Schulte BA. Cytologic structures unique to Delter's cells of the cochlea. *Anat Rec* 1993;237:421–30.
- [5] Barres BA. New roles for glia. *J Neurosci* 1991;11:3685–94.
- [6] Spicer SS, Schulte BA. Spiral ligament pathology in quiet-aged gerbil. *Hear Res* 2002;172:172–85.
- [7] Vater M, Lenoir M, Pujol R. Development of the organ of Corti in horseshoe bats: scanning and transmission electron microscopy. *J Compar Neurol* 1997;377:520–34.
- [8] Thalmann R, Henzl MT, Thalmann I. Specific proteins of the organ of Corti. *Acta Otolaryngol* 1997;117:265–8.
- [9] Kikuchi T, Kimura RS, Paul DP, Adams JC. Gap junctions in the rat cochlea: Immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol* 1995;191:101–18.
- [10] Thalmann R, Henzl MT, Killick R, Ignatova EG, Thalmann I. Towards an understanding of cochlear homeostasis: the impact of location and the role of OCP1 and OCP2. *Acta Otolaryngol* 2003;123:203–8.
- [11] García Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Trinidad A, Zurita M, De la Fuente R, Lobo D. Controversies and criticisms on designs for experimental autoimmune labyrinthitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004;113:404–10.
- [12] Kruger RP, Goodyear RJ, Legan PK, et al. The supporting cell antigen: a receptor-like protein tyrosine phosphatase expressed in the sensory epithelia of the avian inner ear. *J Neurosci* 1999;19:4815–27.
- [13] Lunardi C, Basor C, Leandir M, Navone R, Lestani M, Millo E, et al. Autoantibodies to inner ear and endothelial antigens in Cogan's syndrome. *Lancet* 2002;360:915–21.
- [14] Shimazaki T, Ichimiya I, Suzuki M, Mogi G. Localization of glucocorticoid receptors in the murine inner ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002;111:1133–8.
- [15] García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Millán I, Górriz C, Trinidad A, Arellano B, et al. Sudden presentation of immune-mediated inner ear disease: characterization and acceptance of a cochleovestibular dysfunction. *J Laryngol Otol* 2003;117:775–9.

- [16] Ramírez-Camacho R, Esteban Fernández D, Verdaguer JM, Gómez Gómez MM, Trinidad A, García Berrocal JR, et al. Accumulation of cisplatin in the organ of Corti and brain. Quantification and clearance. *Hear Res* (in revision).
- [17] Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR, Buján J, Martín-Marero A, Trinidad A. Supporting cells as a target of cisplatin-induced inner ear damage: therapeutic considerations. *Laryngoscope* 2004;114:533–7.
- [18] Minami SB, Sha S-H, Schacht J. Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity. *Hear Res* 2004;198:137–43.
- [19] Salto T, Aran J-M. Comparative ototoxicity of cisplatin during acute and chronic treatment. *ORL* 1994;56:315–20.
- [20] Van Ruijven MNM, De Groot JCM, Hendriksen F, Smoorenburg GF. Immunohistochemical detection of platinum-DNA in the cochlea of cisplatin-treated guinea pigs. *Hear Res* 2005;203:112–21.
- [21] Estrem SA, Babin RW, Ryn JH, Moore KC. Cis-diamminedichloroplatinum (II) ototoxicity in the guinea pig. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1981;89:638–45.
- [22] Cardinaal RM, De Groot JCMJ, Huizing EH, Smoorenburg GF, Veldman JE. Ultrastructural changes in the albino guinea pig cochlea at different survival times following cessation of 8-day cisplatin administration. *Acta Otolaryngol* 2004;124:144–54.
- [23] Thalmann I. Proteomics and the inner ear. *Disease Markers* 2001;17:259–70.
- [24] Corwin DT, Cotanche DA. Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science* 1988;240:1772–4.
- [25] Löwerheim H, Furness DN, Kil J, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4084–8.
- [26] Tsue TT, Oesterle EC, Rubel EW. Hair cells regeneration in the inner ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;111:281–301.
- [27] Ryal BM, Rubel EW. Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult Coturnix quail. *Science* 1988;240:1774–6.
- [28] Cotanche DA. Regeneration of the tectorial membrane in the chick cochlea following severe acoustic trauma. *Hear Res* 1987;30:197–206.
- [29] Sage C, Huang M, Karimi K, et al. Proliferation of functional hair cell in vivo in the absence of the retinoblastoma protein. Available from: www.Scienceexpress.org/2005/1-10.1126/science.1106642.
- [30] Ito J, Kojima K, Kawaguchi S. Survival of neural stem cells in the cochlea. *Acta Otolaryngol* 2001;121:140–2.

Available online at www.sciencedirect.com



ANEXO II

The anticancer drug cisplatin induces an intrinsic apoptotic pathway inside the inner ear.

British Journal of Pharmacology 2007;152:1012-20.



RESEARCH PAPER

The anticancer drug cisplatin induces an intrinsic apoptotic pathway inside the inner ear

JR García-Berrocal¹, J Nevado², R Ramírez-Camacho¹, R Sanz³, JA González-García¹,
 C Sánchez-Rodríguez², B Cantos⁴, P España⁴, JM Verdaguer⁵ and A Trinidad Cabezas¹

¹Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain; ²Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Getafe, Madrid, Spain; ³Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario de Getafe, Madrid, Spain; ⁴Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain and ⁵Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

Background and purpose: Ototoxicity is a known adverse effect of cisplatin (CDDP). Since apoptosis is involved in the development of some pathological conditions associated with the administration of anticancer drugs, we examined, using immunohistochemical and electrophysiological techniques, the apoptotic changes in the cochlea of Sprague-Dawley (SD) rats after an injection of CDDP (5 mg kg⁻¹ body weight).

Experimental approach: Luciferase assays were used to determine the different caspase activities and ATP levels in protein extracts of whole cochleae. The expression of several apoptotic-related proteins was measured by means of Western blotting. These analyses were performed 2, 7 and 30 days after the CDDP injection. The auditory brain stem response was obtained before and at the different times after the injection of CDDP, before the animals were killed.

Key results: CDDP significantly increased the levels of caspase-3/7 activity and active caspase-3 protein expression and caspase-3 immunofluorescence staining, caspase-9 activity, and Bax protein expression but decreased Bcl-2 protein expression within the rat cochleae. Threshold shifts were significantly elevated 2 days after CDDP treatment.

Conclusions and implications: These findings support the hypothesis that cisplatin-related apoptosis evokes an intrinsic pathway of pro-apoptotic signalling within the rat cochleae. Thus, selective inhibition of the sequence of events involved in the intrinsic apoptotic pathway could provide a strategy to minimize cisplatin-induced ototoxicity.

British Journal of Pharmacology (2007) 152, 1012–1020; doi:10.1038/sj.bjp.0707405; published online 1 October 2007

Keywords: cisplatin; ototoxicity; apoptosis; caspase-3; caspase-9

Abbreviations: ABR, auditory brainstem response; Bax, Bcl-2 associated X protein; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; CDDP, *cis*-diamminedichloroplatinum II; OHCs, outer hair cells; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase

Introduction

Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum II; CDDP) is a first-generation platinum-containing anticancer drug, known to be effective against a variety of solid tumours. Its anticancer effect is obtained by several mechanisms, including formation of DNA adducts and production of reactive oxygen species (ROS). Second-generation platinum-derived drugs have comparable anticancer effects to cisplatin and although they have several side effects such as myelosuppression, they induce less nephrotoxicity and ototoxicity than CDDP.

Ototoxicity has been observed in up to 36% of patients receiving cisplatin. These patients present with tinnitus and/

or hearing loss in high frequencies; but cisplatin can also affect the speech frequencies (Nagy *et al.*, 1999). Although the dose of cisplatin given is an important factor in achieving optimal antineoplastic effects (Bohm *et al.*, 1999), high doses can cause serious side effects, for example, peripheral neuropathies, renal insufficiency and sensorineural hearing loss. Hearing impairment is dose related, cumulative, bilateral and usually permanent. Initially, it is characterized by a high-frequency deficit, but in patients receiving repeated doses of cisplatin, this progressively extends towards frequencies that are important for speech perception. Cochlear damage is one of the most common reasons for interrupting chemotherapy with this drug.

The most prominent change seen in the cochlea after cisplatin administration consists of loss of outer hair cells (OHCs), initially in the third row of OHC stereocilia bundles at basal turn (tip links, disarrayed or fused, decreased in

Correspondence: Dr JR García-Berrocal, Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, San Martín de Porres 4, Madrid, Spain. E-mail: jrgarciab@yahoo.com
 Received 26 February 2007; revised 18 April 2007; accepted 6 July 2007; published online 1 October 2007

number). Several studies have demonstrated morphological damage in the supporting cells (Estrem *et al.*, 1981; Anniko and Sobin, 1986; Watanabe and Yagi, 2000). Supporting cells (Deiter's cells) appeared more sensitive than OHCs, and the alteration of the supporting cell ultrastructure preceded detectable changes in OHCs (Ramírez-Camacho *et al.*, 2004).

Programmed cell death or apoptosis has been associated with the administration of several anticancer drugs, including CDDP (Lee *et al.*, 2004; Matsushashi *et al.*, 2005). This active form of cell death is characterized by morphological changes such as cell shrinkage, chromatin condensation and fragmentation of DNA, which often requires the synthesis of new proteins called caspases (cysteine-requiring aspartate proteases).

The cytotoxic effects of CDDP are due to coordinative bonds between the atom of platinum and DNA and formation intrastrand DNA crosslinks (McKeage, 1995). Apoptotic death of OHCs has emerged as a final common pathway in response to ischaemia, loss of trophic factor support and ototoxins such as aminoglycoside and cisplatin (Huang *et al.*, 2000). However, the intracellular pathways involved in the stimulus recognition, signal transduction and execution phases of OHCs apoptosis following cisplatin exposure remain unknown. Likewise, inner ear cells are also injured by the generation of free radicals and antioxidant depletion; they cause oxidative injury in the cochlea of the rat (Husain *et al.*, 2001). The two major intracellular apoptosis pathways are the cell-surface death receptor or extrinsic pathway, that is, Fas and Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1 (TNFR1)-mediated apoptosis, (involving procaspase-8 interactions) (Ashkenazi and Dixit, 1998), and the mitochondrion-initiated or intrinsic pathway, regulated by the members of the B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) family (involving procaspase-9 interactions) (Harris and Thompson, 2000). Once activated, both caspases-8 and caspase-9 participate in a cascade that culminates in the activation of caspase-3 that cleaves several substrates, resulting in chromosomal DNA fragmentation and the cellular morphological changes characteristic of apoptosis (Goldstein *et al.*, 2000). Cross-talk has been demonstrated between the two procaspase pathways (Li *et al.*, 1998).

The aim of this study was to explore the effects of cisplatin on the apoptosis of rat cochlear cells, and thereby, to characterize the possible proapoptotic signalling pathways involved, to design strategies to minimize cisplatin-induced ototoxicity.

Methods

Animals

Thirty-six female Sprague-Dawley rats from Harlan (Harlan Iberica, Barcelona, Spain) weighing between 180 and 280 g were used in the present study. After transportation, the animals were maintained in the central animal laboratory for at least 1 week. All animals were housed in plastic cages with water and food available *ad libitum*, and maintained on a 12-h light/dark cycle. Rats with inner ear infection were not used. Cisplatin 5 mg kg⁻¹ in 1.0 ml normal solution (0.9% NaCl) was injected intraperitoneally. Animals were then

observed for poor food and water intake and divided into three groups as follows: (1) (*n* = 10) rats were killed 2 days after CDDP administration, (2) (*n* = 10) animals were killed 7 days after CDDP treatment and (3) (*n* = 10) were killed 30 days after CDDP injection. In the control group (*n* = 6), only 10 ml kg⁻¹ NaCl 0.9% w/v was injected; animals were killed at 2 days (*n* = 2), at 7 days (*n* = 2) and at 30 days (*n* = 2).

Auditory brainstem response measurements

Preyer's reflex and otoscopy were used to confirm that middle ears were normal. Evoked potentials were recorded before drug administration and before the animals were killed. Rats were anaesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine 100 mg kg⁻¹, diazepam 0.1 mg kg⁻¹ and atropine 0.02–0.04 mg kg⁻¹. Subdermal platinum-alloy needle electrodes were attached, with the active lead at the vertex and referred to a second electrode located at the tip of the nose. The ground electrode was placed on the arm muscles. Auditory brainstem response (ABR) stimuli were generated using a Medelec Synergy System (Oxford Instruments Medical Systems, Surrey, UK); 10-ms tone burst stimuli (8 kHz) were delivered monaurally through a hollow rat ear bar. Tone bursts (rise-fall time 2 ms, duration 10 ms) were delivered at the rate of 20 s⁻¹, with increasing intensity from 10 to 80 dB sound-pressure level in 5-dB steps; 1500 trials were averaged to assure an adequate brain response. The lowest response that clearly demonstrated a reproducible waveform was interpreted as the threshold response.

Preparation of tissues

After fixation by intralabyrinthine perfusion of 4% paraformaldehyde (pH 7.4), cochleae were removed. Right cochleae were used for the immunohistochemical study, and then were incubated in the same fixative overnight. Decalcification was performed in ethylenediamine tetraacetic acid solution (10% in phosphate-buffered saline) for 3–4 weeks. Subsequently, the tissues were embedded in paraffin.

Structure examination

Each paraffin-embedded specimen was sectioned at a thickness of 5 µm. The paraffin was removed by immersion in graded series of ethanol (from 100 to 70 °C), and then each section was stained with a haematoxylin-eosin solution and observed with an Olympus BX-51 microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

Immunofluorescence examination

Although this study does not constitute a main objective of the present investigation, preliminary results may support and implicate the role of caspase-3 in the toxic effect of CDDP on the different cell populations of the inner ear. For immunofluorescence analysis, paraffin was removed from the sections before they were incubated with an antibody against active caspase-3 protein. Paraffin was washed from the cochlear sections, as indicated above, before they were embedded into a citrate buffer (0.1 M citric acid plus 0.1 M sodium citrate in bi-distilled water) and heated in a

microwave. Specimens were subsequently washed and incubated with phosphate buffered saline 0.1M solution (vol/vol) + 0.3% (vol/vol) Tween-20 and 5% bovine serum albumin for 60 min at 37 °C. After that, sections were incubated with caspase-3 antibody Ab13847 (dilution 1/500) diluted in phosphate buffered saline + 1% bovine serum albumin for 60 min at 37 °C. Secondary antibody Alexa Fluor (R) 546 (dilution 1/1500) was added for 45 min at 37 °C. Specimens were embedded in Moviol 4-88 supplemented with 300 nM of 49, 6-diamidino-2-phenylindole. Sections were observed with an Olympus BX-51 epifluorescence microscope. All tissue sections were counterstained with haematoxylin-eosin.

Western blotting and protein content

Extraction of protein homogenates and western blotting were performed as described previously (Nevado *et al.*, 2006). Briefly, protein from rat cochlea was extracted in lysis buffer containing 10 mM Tris pH 7.4, 1% sodium dodecyl sulphate, 10 mM orthovanadate, 2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride and 12.5 µg ml⁻¹ aprotinin. Total protein extracts were diluted 3:1 in 4 × Laemmli's buffer and boiled for 5 min. Proteins were loaded equally (10 µg per lane), separated on 8% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis gels and transferred onto a nitrocellulose membrane. After being blocked overnight at 4 °C in 0.2% Tween-20 and 5% non-fat dry milk, the membrane was incubated for 1 h at room temperature, with a polyclonal antibody against either Bcl-2 (Ab7973, dilution 1/200), or monomeric Bcl-2-associated X protein (Bax) (Ab16837, dilution 1/200), or active caspase-3 proteins (Ab13847, dilution 1/200), followed by incubation for 45 min with the respective anti-mouse or anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (dilution 1/10 000). Immunoreactive bands were detected using an enhanced chemiluminescence detection kit and quantified using Chemi-Imager 5.5 software from AlphaInnotech (San Leandro, CA, USA). The data from the densitometric analysis are representative of the mean results from four experiments.

Measurements of activity of different caspases, and quantification of ATP levels

Left cochlea were used to analyse different apoptosis-related caspase activities. Thus, protein extracts of whole cochlea were obtained by using mammalian protein extraction reagent, with the addition of Complete mini protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. The homogenates were treated for 3 min with a homogenizer ultra-Turrax T8 (IKA, Staufen, Germany) followed by 1 min on ice. This treatment was repeated twice. The lysate was cleared by centrifugation at 16 100 g for 10 min at 4 °C to pellet the cell debris, and the supernatant was used or immediately stored at -80 °C. The protein concentration was determined by the BCA protein assay. For the quantification of different caspase activities, different luminescent assays were used according to the manufacturer's instructions; each assay provides a specific pro-luminescent

substrate, which contains tetrapeptide sequences, DEVD (for caspase-3/7), LETD (for caspase-8) and LEHD (for caspase-9) that have been shown to be selective for caspase-3/7, caspase-8 and caspase-9, respectively (Thornberry *et al.*, 2000). Luminescence is proportional to the amount of respective caspase activities present, and 10 µg proteins were utilized to normalize.

The CellTiter-Glo reagent was used to measure ATP in whole cell protein extracts by following the manufacturer's protocol, and 10 µg of protein were utilized to normalize the results.

Measurement of total superoxide dismutase activity

To analyse the antioxidant enzyme activity in cisplatin-induced ototoxicity, total superoxide dismutase (SOD) activity was measured in whole rat cochlear extracts by using an SOD activity kit, a colorimetric method. This kit measures all the three types of SOD (Cu/Zn-, Mn- and Fe-SOD), and utilizes a tetrazolium salt for detection of superoxide radicals generated by xanthine oxidase and hypoxanthine in these tissue homogenates. SOD activity is standardized using the cytochrome c- and xanthine oxidase-coupled assay. One unit of activity is defined as the activity of enzyme required to inhibit the production of formazan by 50%.

Ethics

The study was carried out in accordance with the guidelines for research involving animals (the Spanish Animal Care and Use Committee), and was approved by the Clinical Research and Ethics Committee of Hospital Universitario Puerta de Hierro (Exp. PI050673, 28 June 2005).

Statistical analyses

Results are expressed as mean ± s.e.mean. The statistical analysis was carried out using the Stat-View statistics programme (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA). Differences between the means or in the variance were evaluated using the factorial analysis of variance, followed by Fisher's protected least-significance-test, with the level of significance set at $P \leq 0.05$. The sample size and statistical power of the study (95%) were calculated using the C4 Study Design Pack program (GSK Biometry Department, Madrid, Spain).

Materials

The following materials were used in the experiments: cisplatin (Ferra Farma, S.A., Barcelona, Spain), Ab13847 (AbCam, Cambridge, UK), Alexa Fluor (R) 546 (Molecular Probes/Invitrogen Ltd, Paisley, UK), Moviol 4-88 (Hoechst Pharmaceuticals, Frankfurt, Germany), nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain), polyclonal and secondary antibodies (AbCam), enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham, Arlington Hills, IL, USA), mammalian protein extraction reagent (Pierce, Rockford, IL, USA), Complete mini protease inhibitor cocktail (Boehringer

Mannheim GmbH), Bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce), luminescent assays (Caspase-Glo-3/7; Caspase-Glo-8 and Caspase-Glo-9; Promega, Madison, WI, USA), CellTiter-Glo reagent (Promega) and SOD activity kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA).

Results

Threshold shifts of ABR

The ABR thresholds were elevated in animals from all groups after CDDP treatment (Figure 1). ABR thresholds from the 2-day treatment group were elevated from 21.5 ± 7 (mean \pm s.d.) to 30.5 ± 5.9 dB. At 7 days, ABR examination showed an increase from 26.2 ± 6.7 to 39.3 ± 16.1 dB. In the 30-day group ABR was elevated from 27.2 ± 8.5 to 37.5 ± 14 dB. However, this increase was only significant in the 2-day group ($P \leq 0.05$). No changes in the threshold were apparent in the control group.

Cisplatin-related apoptosis in the rat cochlea

We monitored caspase-3/7 activities as an early indicator of apoptotic cell death in whole-protein extracts from rat cochlea, at different times after CDDP injection. The results presented in Figure 2a show that caspase-3/7 activities in the protein extracts clearly increased with the CDDP treatment. Thus, rats from both the 2-day and 7-day groups showed increased caspase-3/7 activity compared with the control groups ($P \leq 0.001$). However, rats from the 30-day group showed a decreased caspase-3/7 activity compared with the 7-day and 3-day groups, although the difference from the control group was still statistically significant ($P \leq 0.001$). In addition, ATP levels present in these extracts clearly decreased with time (Figure 2b). Again in the 30-day group the ATP was no longer decreased, but had almost returned to control levels.

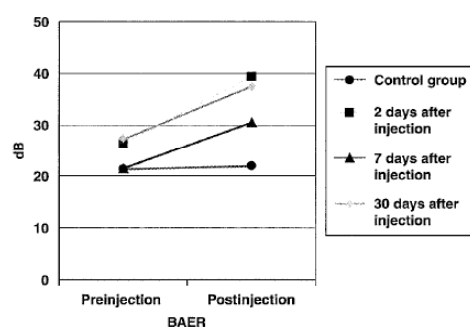


Figure 1 Threshold shifts of ABR. The ABR threshold shift was significantly elevated only in the animals killed 2 days after cisplatin (CDDP) administration. Animals from the 7-day and 30-day groups showed a non-significant increase in the ABR threshold shift. ABR, auditory brainstem response; CDDP, *cis*-diamminedichloroplatinum II.

We also analysed 'active p-17' caspase-3 protein expression by western blotting. A representative western blot is shown in Figure 3a; the results obtained confirmed a higher active caspase-3 protein expression with CDDP treatment. Densitometric analyses of at least four independent experiments confirmed that CDDP treatment increased caspase-3 protein expression in the rat cochlea. The amount of caspase-3 expressed was significantly increased compared with the control group in both the 2-day and 7-day cisplatin-treated groups (Figure 3a). The last group that was killed 30 days after CDDP treatment also showed an increase in the active caspase-3 protein expression, but this was not statistically significant (Figure 3a).

Caspase-3 immunofluorescence staining

We selected the cochlear sections from animals killed at 7 days after CDDP administration, since they presented the highest caspase-3 activity in the whole cochlear extracts. Preliminary results showed caspase-3 activity in different cell populations of the organ of Corti, such as the interdental cells of the spiral limbus, inner sulcus cells, inner and OHCs and Hensen's cells. Likewise, there was a more intense staining for caspase-3 in Reissner's membrane and marginal

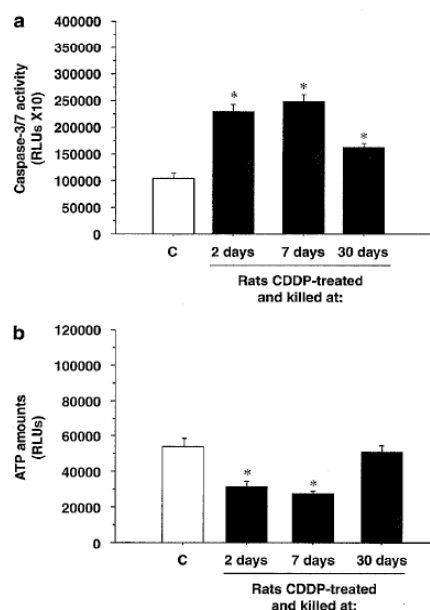


Figure 2 Cisplatin-related apoptosis in rat cochlea. Caspase-3/7 activity (a) and ATP levels (b) were measured in whole cochlea protein extracts of rats killed 2, 7 or 30 days after CDDP injection. Results are expressed as RLUs (relative light units); * $P \leq 0.05$ vs control group. CDDP, *cis*-diamminedichloroplatinum II.

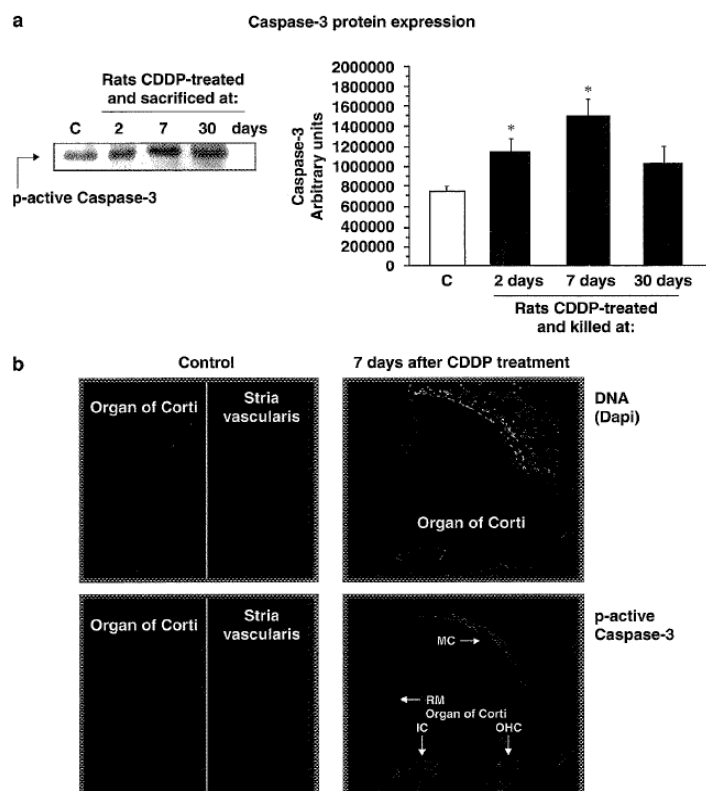


Figure 3 Active caspase-3 expression. (a) A representative western blot of active p-17 caspase-3 protein expression levels in whole cochlea extracts of rats killed at 2, 7 or 30 days after CDDP injection is shown (left). Densitometric analyses of previous western blots are also shown (right). Results are expressed as arbitrary units; * $P \leq 0.05$ vs control. (b) Immunostaining of active caspase-3 in the nuclei of inner ear cells from rats 7 days after a single dose of cisplatin (5 mg kg^{-1}). Cryosections from the cochleae of exposed animals were stained (see Methods section). Increased nuclear caspase-3 immunostaining is seen in several cell populations after administration of cisplatin. MC, marginal cells of stria vascularis; RM, Reissner's membrane; OHCs, outer hair cells; IC, interdental cells of the spiral limbus. Magnification $\times 400$. CDDP, cis-diamminedichloroplatinum II.

cells of the stria vascularis, in comparison with animals from the control group (Figure 3b).

Cisplatin-associated cochlear apoptosis in the rat involved an 'intrinsic' mitochondria-initiated cell-death pathway

To distinguish the apoptotic signalling pathways activated by CDDP treatment in the rat cochleae, caspase-8 and caspase-9 activities as initiator caspases were determined by specific luminescence assays. Figure 4a shows that only a significant time-dependent decrease in caspase-8 activity was observed in the 7-day group. On the other hand, the group killed 30 days after the treatment showed levels of caspase-8 slightly higher than controls. Likewise, caspase-9 activity was clearly increased by CDDP administration. An increased

glow-luminescence was seen in all three treated groups, and this was maximum in the 7-day group (Figure 4b).

To confirm the involvement of the intrinsic pathway of proapoptotic signalling, we also determined Bcl-2 and Bax protein expressions by western blotting. Bcl-2 is a member of Bcl-2 family of proteins, which normally inhibits cell death by blocking the binding of caspase-9 to the apoptotic protease activating factor 1 complex. Figure 5b shows that Bcl-2 protein expression is higher in protein extracts from control rats (392434 ± 22963 arbitrary units), than in the extracts from the rats treated with cisplatin for 2 and 7 days. However, in the 30-day group the expression of this protein was lower than in the control group. In contrast, Bax protein expression (a proapoptotic protein) was clearly increased by CDDP treatment in the 2-day and 7-day groups (Figure 5a). The last group, which was killed at 30 days after CDDP

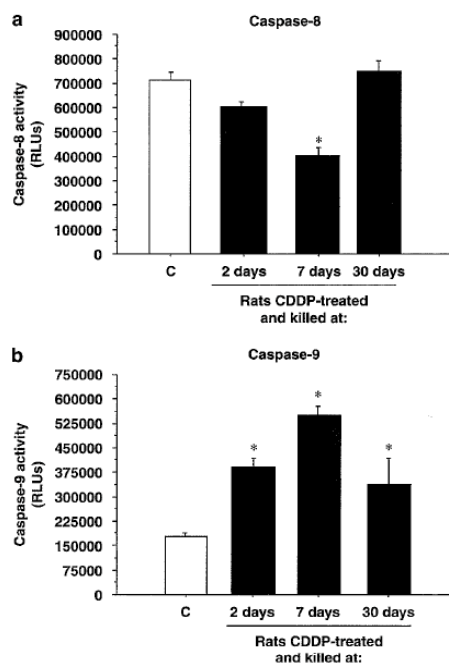


Figure 4 Caspase-8 and caspase-9 activities. Caspase-8 (a) and caspase-9 (b) activities were measured in rat cochlea protein extracts of rats killed at 2, 7 or 30 days after CDDP injection. Results are expressed as RLUs (relative light units); * $P \leq 0.05$ vs control group. CDDP, *cis*-diamminedichloroplatinum II.

treatment, showed no significant differences from the control group (Figure 5a).

CDDP administration changes the level of total SOD activity inside the cochlea

A significant increase in the total SOD activity in whole cochlear extracts was observed in the animals from the CDDP-treated groups compared with controls (Figure 6). Likewise, differences between CDDP groups were also statistically significant (for 2 days after treatment rats vs either 7-day or 30-day rats; $P \leq 0.0001$ and $P = 0.0002$ respectively; or 7 days after treatment rats vs 30 days; $P = 0.04$).

Discussion and conclusions

Although the ototoxic effect of cisplatin has been extensively studied, the cellular mechanisms by which cisplatin induces loss of OHCs, and subsequent degeneration of the organ of Corti remains elusive. Furthermore, the cellular sites of cisplatin uptake and accumulation in the cochlea have not yet been properly identified. It is commonly

accepted that binding of cisplatin to DNA results in the formation of cisplatin-DNA adducts that produce severe distortions in the DNA double helix. This antineoplastic effect is mediated by the platination of nucleophilic centres in DNA bases, leading to intra- or inter-strand crosslinking of the bases, to abnormal base pairing or to DNA strand breakage. One important way by which cisplatin-DNA adducts may kill cells is by the induction of programmed cell death or apoptosis (Lee *et al.*, 2004). A high accumulation of platinum-DNA adducts has been observed in the nuclei of marginal cells of the stria vascularis, but not in OHCs that have been discussed as the main target of cisplatin-induced cell damage (Thomas *et al.*, 2006). The augmented adduct levels in the nuclei of marginal cells are not caused by their inability to repair such DNA lesions (Siddik, 2003). When disregarding the impact of repair mechanisms, the level of DNA platination products is directly linked to the intracellular concentration, which can be increased by both excessive influx and decreased export. For the platinum drugs such membrane transport mechanisms are not yet fully understood. The excessive DNA platination in the marginal cells represents the earliest event in short-term cisplatin ototoxicity triggering their functional impairment and apoptotic destruction. Marginal cell damage may lead to an impaired uptake of K^+ from the intrastrial space, as well as an impaired K^+ secretion into the endolymph with subsequent dysfunction and loss of hair cells. The impairment of K^+ -recycling process that is essential to the endocochlear potential, is a toxic effect of cisplatin induced by apoptosis of type I spiral ligament fibrocytes (Liang *et al.*, 2005) and by the direct apoptotic effect of cisplatin on the stria vascularis, responsible for the decreased cellular Na^+ , K^+ ATPase and Ca^{2+} ATPase activities (Cheng *et al.*, 2005).

Apoptosis in the stria vascularis cells on day 3 following CDDP treatment has been suggested by Lee *et al.* (2004). Morphologically, oedema formation in the stria vascularis was followed by severe atrophy after CDDP treatment. The majority of marginal cells affected by CDDP exhibited expression of cleaved caspase-3, indicating that caspases are involved in the process of apoptotic cell death after CDDP treatment. However, they showed expression of cleaved caspase-9, indicating that apoptosis was initiated by permeabilization of mitochondrial membranes. Our data pointed to the existence of caspase-mediated apoptosis after CDDP treatment within the rat cochlea, by different approaches. Quantification of the ATP levels (showing a significant decreased with CDDP administration) in the whole cochlea protein extracts also supported these results. Decreased levels of ATP have been found in apoptotic cells, according with an increased energy requirement by cells undergoing cell death by apoptosis (Eguchi *et al.*, 1997). Our data also support the involvement of the 'intrinsic' mitochondrial-initiated cell death-signalling pathway by CDDP in rat cochleae. Thus, cochlear extracts exhibited a progressively higher expression of caspase-9, with a maximum on the seventh day and a decline by the 30th day after CDDP treatment.

Interestingly, we showed the existence of CDDP-dependent caspase-9 activation, relating to a clear modulation of protein expression levels of Bax, involved in the control and

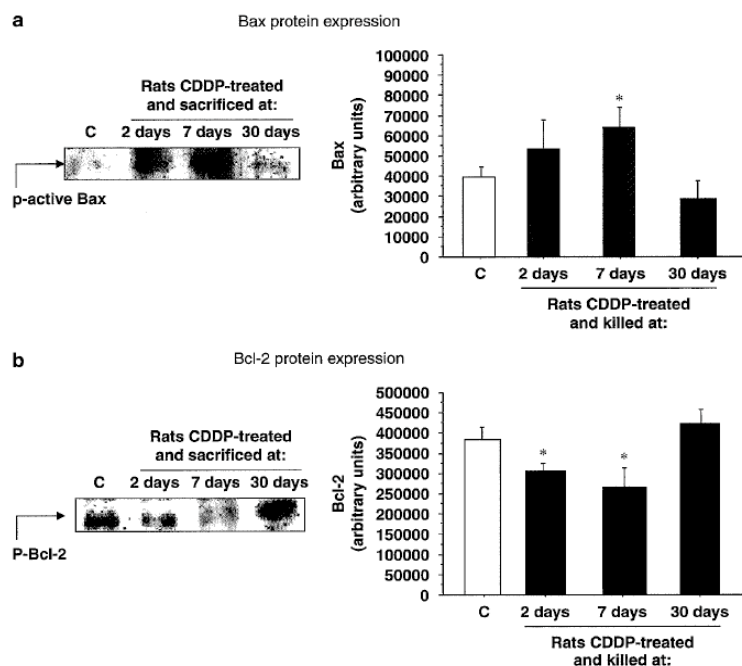


Figure 5 Bax and Bcl-2 protein expressions. Representative western blots of active Bax (a, left) or Bcl-2 (b, left) protein expressions in whole cochlea extracts of rats killed at 2, 7 or 30 days after CDDP injection are shown. Densitometric analyses of previous western blots are also shown (right). Results are expressed as arbitrary units; * $P \leq 0.05$ vs controls. CDDP, cis-diamminedichloroplatinum II.

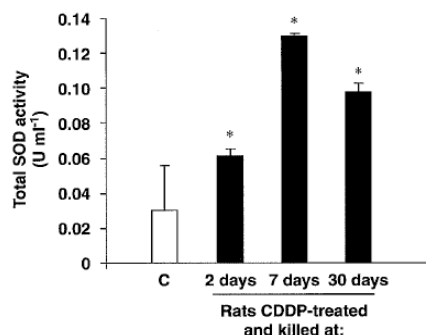


Figure 6 CDDP treatment modulates total SOD activity in rat cochlea. Total SOD activity is measured in whole cochlear extracts of rats killed at 2, 7 or 30 days after CDDP injection. Results are expressed as U ml⁻¹. One unit of activity is defined as the activity of enzyme required to inhibit the production of formazan by 50%; * $P \leq 0.05$ vs control group. CDDP, cis-diamminedichloroplatinum II; SOD, superoxide dismutase.

execution of the intrinsic mitochondrial cell-death pathway. Our results implicating Bax complement previous studies showing overexpression of Bax and downregulation of Bcl-2

in the organ of Corti of gerbils exposed to cisplatin (Alam *et al.*, 2000). Although previous studies have shown that initial activation of caspase-8 can induce caspase-9 activation (Li *et al.*, 1998), we did not observed activation of caspase-8.

Animals with a long-term survival after the cisplatin injection (30-day group) presented caspases activities, Bcl-2 and Bax protein expression and ATP levels similar to those observed in the control group. A plausible hypothesis could be that once the initial toxic stimulus has occurred, cells develop repair mechanisms and, consequently, the apoptosis ceases. Previous results suggesting that the toxic drug initially affects the stria vascularis and/or the supporting cells (Deiter's and Hensen's), leading to an impaired uptake and secretion of K⁺ into the endolymph, and an impairment of the metabolic homeostasis of outer and inner hair cells, respectively, that experience structural and functional lesions (Ramírez-Camacho *et al.*, 2006), require a profound re-analysis, since the present study has shown a probable implication of many cell types. The biochemical mechanisms by which cisplatin activates the intrinsic apoptotic pathway remain incompletely understood. Although the interaction of cisplatin with nuclear DNA may have important cellular effects contributing to apoptosis, mitochondria may be the principal and only target of cisplatin (Devarajan *et al.*, 2002; Cardinaal *et al.*, 2004).

Cisplatin may directly lead to the generation of ROS or may induce the release of reactive oxygen molecules normally sequestered within mitochondria that may trigger several mechanisms of apoptosis. ROS-mediated damage could occur as a consequence of antioxidant depletion and increased lipid peroxidation in the cochlea of rats (Rybak *et al.*, 1999). Unpublished data from our investigation show a high ROS activity in cochlear extracts from controls very similar to that observed in animals treated with CDDP. This finding is consistent with the incessant metabolic production of ROS observed in all cell types of the inner ear, independent of exposure to cisplatin (Evans and Halliwell, 1999). Furthermore, compared with basal levels in untreated control cochleae, no additional formation of the DNA oxidation product 8-oxoguanine was detectable after cisplatin treatment in the DNA of either inner ear cell type (Thomas *et al.*, 2006). Our results, however, do not completely rule out the concept of free radical-induced damage to other cell organelles.

Total SOD activity analysis presented a significantly increase of this free-radical scavenger. This finding could be relevant since we used a low CDDP dose (5 mg kg^{-1}) to reproduce the therapeutic administration usually used in humans; in our model, cells will initially increase the antioxidant enzymes to minimize ROS-induced damage. A depletion of SOD was observed in animal models that have used a higher dose (16 mg kg^{-1}) (Rybak *et al.*, 1999). Another emerging problem concerning the use of high doses of cisplatin is the different cell death-induced pattern; at lower doses, the proapoptotic initiator caspases-8 and caspase-9, and the executioner caspase-3 are activated and result in apoptosis. In contrast, higher doses of cisplatin are accompanied by a decline in caspase-3 activity and widespread cell necrosis (Lieberthal *et al.*, 1996).

According to our immunofluorescence analysis, preliminary results after CDDP administration showed that caspase-3 expression was stimulated in diverse cell populations inside the cochlea. Traditionally, the main role in cisplatin-induced ototoxicity has been attributed to OHCs. However, our findings demonstrate that cell types other than OHCs may be implicated. Thus, the interdental cells of the spiral limbus, inner sulcus cells, inner and OHCs and Hensen's cells presented significant caspase-3 expression after CDDP injection. Likewise, Reissner's membrane and marginal cells of the stria vascularis also showed such as expression. These latter findings have also recently been observed in guinea pig cochleae after short-term exposure to cisplatin, by detecting fragments of single-stranded DNA (Watanabe *et al.*, 2002) and guanine-guanine intrastrand crosslinks in DNA (Thomas *et al.*, 2006). These authors have suggested that marginal cells of the stria vascularis have a major role in the early events of cisplatin ototoxicity. The more extensive effects observed in our study could be due to the different times used to analyse the effects of the drug: 7 days (present study) vs 1–3 days (Lee *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2006), following cisplatin administration. The results from our study indicate that a profound re-examination of the possible role of the apoptosis of different inner ear cells following cisplatin treatment should be undertaken.

One restrictive factor for the study of the potential therapies used to limit the ototoxicity is the functional and morphological recovery of the organ of Corti after cessation of cisplatin administration (Cardinaal *et al.*, 2000). This finding suggests several hypotheses: an intrinsic regenerative mechanism (Cardinaal *et al.*, 2000), an efficient drug clearance system inside the inner ear and/or a step-by-step damage of the cochlea (Ramírez-Camacho *et al.*, 2004). Thus, the reversal or cessation of the damage to the stria vascularis marginal cells and spiral ligament fibrocytes could prevent injury of the organ of Corti. This hypothesis may have clinical implications, since recovery of cisplatin-induced hearing loss has been reported to occur in some patients. Likewise, the inter-individual variability in susceptibility to the ototoxic effect observed in our animals could also be explained by the previous hypotheses. A variety of antioxidants have been shown to attenuate cisplatin-induced apoptosis in the organ of Corti (Lopez-Gonzalez *et al.*, 2000; Rybak and Kelly, 2003). Thus, several strategies have been suggested to prevent the oxidative stress-induced apoptosis of OHCs that have been exposed to cisplatin: prevention of the formation of ROS either by binding the toxin or reversing the binding of the toxin, inhibition of the lipid peroxidation, addition of exogenous free-radical scavengers and antioxidant enzymes, inhibitors of caspases and gene therapy (to upregulate antiapoptotic gene products such as Bcl-2) (Lopez-Gonzalez *et al.*, 2000; Rybak and Kelly, 2003).

In conclusion and according to our findings, selective inhibition of the sequence of events involved in the intrinsic apoptotic pathway could provide a strategy to minimize cisplatin-induced ototoxicity.

Acknowledgements

This study was supported by Spanish Research Fund (FIS) PI05/0673. JN was a recipient of a Research Contract from ISC III (FIS 99/3077).

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

References

- Alam SA, Ikeda K, Oshima T, Suzuki M, Kawase T, Kikuchi T *et al.* (2000). Cisplatin-induced apoptotic cell death in Mongolian gerbil cochlea. *Hear Res* 141: 28–38.
- Anniko M, Sobin A (1986). Cisplatin: evaluation of its ototoxic potential. *Am J Otol* 7: 276–293.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998). Death receptors: signalling and modulation. *Science* 281: 1305–1308.
- Bohm S, Oriana S, Spatti G, Di Re F, Breasciani G, Pirovano C *et al.* (1999). Dose intensification of platinum compounds with glutathione protection as induction chemotherapy for advanced ovarian carcinoma. *Oncology* 57: 115–120.
- Cardinaal RM, De Groot JC, Huizing EH, Smoorenburg GF, Veldman JE (2004). Ultrastructural changes in the albino guinea pig cochlea at different survival times following cessation of 8-day cisplatin administration. *Acta Otolaryngol* 124: 144–154.

- Cardinaal RM, De Groot JCMJ, Huizing EH, Veldman JE, Smoorenburg GF (2000). Cisplatin-induced ototoxicity: morphological evidence of spontaneous outer hair cell recovery in albino guinea pigs? *Hear Res* 44: 147–156.
- Cheng FW, Liu SH, Hsu CJ, Lin-Shiau SY (2005). Correlation of increased activities of Na^+ , K^+ ATPase and Ca^{2+} ATPase with the reversal of cisplatin ototoxicity induced by D-methionine in guinea pigs. *Hear Res* 205: 102–109.
- Devarajan P, Savoca M, Castaneda MP, Park MS, Esteban-Cruciani N, Kalinec G et al. (2002). Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: role of death receptor and mitochondrial pathways. *Hear Res* 174: 45–54.
- Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57: 1835–1840.
- Estrem SA, Babin RW, Ryu JH, Moore KC (1981). Cis-diamminedichloroplatinum (II) ototoxicity in the guinea pig. *Otolaryngol Head Neck Surg* 89: 638–645.
- Evans P, Halliwell B (1999). Free radicals and hearing. Cause, consequence and criteria. *Ann N Y Acad Sci* 884: 19–40.
- Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2: 156–162.
- Harris MH, Thompson CB (2000). The role of Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ* 7: 1182–1191.
- Huang T, Cheng AG, Stupak H, Liu W, Kim A, Staeker H et al. (2000). Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: otoprotective strategies. *Int J Dev Neurosci* 18: 259–270.
- Husain K, Scott RB, Whitworth C, Somani SM, Rybak LP (2001). Dose response of carboplatin-induced hearing loss in rat. *Hear Res* 151: 71–78.
- Lee JE, Nagakawa T, Kita T, Kim TS, Iguchi F, Endo T et al. (2004). Mechanisms of apoptosis induced by cisplatin in marginal cells in mouse stria vascularis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 66: 111–118.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998). Cleavage of Bid by caspase 8 mediated the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491–501.
- Liang F, Schulte BA, Qu C, Hu W, Shen Z (2005). Inhibition of the calcium and voltage-dependent big conductance potassium channel ameliorates cisplatin-induced apoptosis in spiral ligament fibrocytes of the cochlea. *Neuroscience* 135: 263–271.
- Lieberthal W, Triaca V, Levine J (1996). Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs necrosis. *Am J Physiol* 270: 700–708.
- Lopez-Gonzalez MA, Guerrero JM, Rojas E, Delgado F (2000). Ototoxicity caused by cisplatin is ameliorated by melatonin and other antioxidants. *J Pineal Res* 28: 73–80.
- Matsuhashi N, Saio M, Matsuo A, Sugiyama Y, Saji S (2005). Apoptosis induced by 5-fluorouracil, cisplatin and paclitaxel are associated with p53 gene status in gastric cancer cell lines. *Int J Oncol* 26: 1563–1567.
- McKeage MJ (1995). Comparative adverse effect profiles of platinum drugs. *Drug Saf* 13: 226–244.
- Nagy JL, Adelstein DJ, Newman CW, Rybicki LA, Rice TW, Lavertu P (1999). Cisplatin ototoxicity: the importance of baseline audiometry. *Am J Clin Oncol* 28: 305–308.
- Nevado J, Sanz R, Casqueiro JC, Ayala A, García-Berrocal JR, Ramirez-Camacho R (2006). Ageing evokes an intrinsic pro-apoptotic signalling pathway in rat's cochlea. *Acta Otolaryngol* 126: 1134–1139.
- Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR, Buján J, Martín-Marero A, Trinidad A (2004). Supporting cells as a target of cisplatin-induced inner ear damage: therapeutic implications. *Laryngoscope* 114: 533–537.
- Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR, Trinidad A, González-García JA, Verdagué JM, Ibáñez A et al. (2006). Central role of supporting cells in cochlear homeostasis and pathology. *Med Hypotheses* 67: 550–555.
- Rybak LP, Kelly T (2003). Ototoxicity: bioprotective mechanisms. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 11: 328–333.
- Rybak LP, Husain K, Whitworth C, Somani SM (1999). Dose dependent protection by liponic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats: antioxidant defense system. *Toxicol Sciences* 47: 195–202.
- Siddik ZH (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22: 7265–7279.
- Thomas JP, Lautermann J, Liedert B, Seller F, Thomale J (2006). High accumulation of platinum-DNA adducts in stria marginal cells of the cochlea is an early event in cisplatin but not in carboplatin ototoxicity. *Mol Pharmacol* 70: 23–29.
- Thornberry NA, Chapman KT, Nicholson DW (2000). Determination of caspase specificities using a peptide combinatorial library. *Meth Enzymol* 322: 100–110.
- Watanabe K, Yagi T (2000). Expression of myeloperoxidase in the inner ear of cisplatin-treated guinea pigs. *Anticancer Drugs* 11: 727–730.
- Watanabe K-I, Jinnouchi K, Hess A, Michel O, Baba S, Yagi T (2002). Carboplatin induces less apoptosis in the cochlea of guinea pigs than cisplatin. *Chemotherapy* 48: 82–87.

ANEXO III

HSP-70 as a nonspecific early marker in cisplatin ototoxicity.

Acta Oto-Laryngologica 2007;127:564-7.

Acta Oto-Laryngologica, 2007; 127: 564–567

informa
healthcare

REVIEW ARTICLE

HSP-70 as a nonspecific early marker in cisplatin ototoxicity

R. RAMÍREZ-CAMACHO¹, M.J. CITORES², A. TRINIDAD¹, J.M. VERDAGUER³,
J.R. GARCÍA-BERROCAL¹, A. MARTÍN MARERO¹, A. PUENTE¹,
J.A. GONZÁLEZ-GARCÍA¹, & J.A. VARGAS²

¹Ear Research Group, Department of Otorhinolaryngology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, ²Department of Internal Medicine I, Hospital Universitario Puerta de Hierro and ³Department of Otorhinolaryngology, Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

Abstract

Conclusion. The great variety of pathological entities related to the presence of circulating HSP-70 suggests a nonspecific cellular damage. As the present study shows, positive results decrease with respect to the time elapsed after the injection of the ototoxic agent. HSP-70 appears as an early and transient marker that could permit early detection of inner ear damage. **Objectives.** The aim of this study was to determine the presence of HSP-70 at different time points by means of Western blot immunoassay in the sera of rats treated with cisplatin. **Materials and methods.** Thirty-six Wistar rats were intraperitoneally injected with cisplatin at a dose of 5 mg/kg and blood samples were collected at 7 and 90 days. Determination of HSP-70 was made by means of a modified Western blot immunoassay kit originally used for human HSP-70 antigen detection. A control group of 18 animals was used for comparison. **Results.** Western blot was positive in 77.8% of the animals in the 7 days group, decreasing to a 44.4% in the 90 days group. In the control group, Western blot was positive in 5.5%.

Keywords: Ototoxicity, Western blot, heat shock proteins, rat

Introduction

Many attempts have been made to develop assays for early detection of inner ear damage. Thus, a simple blood test would allow the clinician to detect early damage and to set up measures to prevent or stop the injury. In the 1990s, HSP-70 was proposed as a highly specific marker for diagnosis of hearing loss of immune origin and as a predictor of therapy outcome [1], although several studies have reported similar percentages of positive results in patients and controls [2,3].

The role of heat shock proteins has also been studied in other inner ear diseases, such as cisplatin ototoxicity. Cis-diamminedichloroplatinum or cisplatin is an effective anticancer drug widely used in the treatment of a variety of epithelial tumors. Cisplatin has severe side effects such as renal insufficiency and ototoxicity, which remain a major dose-limiting factor in cisplatin-based chemotherapy.

This drug accumulates in higher quantities in inner ear than in other organs such as brain and liver (R. Ramírez-Camacho, unpublished data). HSP-72 has been found in the cochlea of rats after cisplatin administration [4].

The aim of the present study was to determine the evidence of serum antibodies against HSP-70 in rats treated with cisplatin to investigate the value of HSP-70 as a potential marker for detection of sensorineural hearing loss (SNHL) of toxic origin.

Materials and methods

Experimental design

Fifty-four male Wistar rats weighing from 200 to 300 g were used in this study. All animals had normal tympanic membranes and positive Preyer's reflex. All of them were individually housed in cages at 24°C on a 12-h light/dark cycle. The experimental

Correspondence: Almudena Trinidad, Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, San Martín de Porres, 4. 28035 Madrid, Spain. Tel: +34 1 3445409. Fax: +34 1 3730535. E-mail: atrinidad@yahoo.es

(Received 15 June 2006; accepted 11 July 2006)

ISSN 0001-6489 print/ISSN 1651-2551 online © 2007 Taylor & Francis
DOI: 10.1080/00016480600951483

HSP-70 in cisplatin ototoxicity 565

design was reviewed and approved by the Animal Research Committee of the Puerta de Hierro Hospital and animals were handled following the guidelines of the National Council for the Care of Laboratory Animals.

Thirty-six animals were included in the cisplatin group and 18 in the control group. Study animals were randomly assigned to the short (7 days) and long-term (90 days) survival groups (18 animals each). Animals within the control group were distributed at random in short and long survival groups so that 9 animals were sacrificed at 7 days and 9 animals at 90 days.

Animals were anesthetized with a combination of ketamine (100 mg/kg) and diazepam (0.1 mg/kg) given intraperitoneally and hearing function was tested. Animals in the study group were subsequently injected with cisplatin at a dose of 5 mg/kg (Ferrer Farma S.A., Spain). Hearing was also measured prior to sacrifice.

Hearing function study

Animals were tested in an acoustically shielded booth. Brain auditory evoked responses (BAERs) were measured in both ears. A differential active electrode was placed subcutaneously below the tested ear, a reference electrode at the vertex, and a ground electrode below the ipsilateral ear. The sound stimulus consisted of 8 KHz tone bursts (rise-fall time 1 ms, duration 10 ms) generated by a Medelec Synergy Generator. Stimuli were presented to the external auditory meatus in a closed acoustic system through a tube connected to the ear canal. In all, 1500 presentations, delivered at the rate of 10 times per second, were averaged to obtain a waveform. Hearing threshold was defined as the lowest stimulus intensity that produced a reliable wave.

Instrumentation is routinely revised every 6 months and stimuli are calibrated before a BAER session.

Sacrifice procedure and temporal bone processing

Before sacrifice, animals were anesthetized for BAER measurement and 2 ml of blood from cardiac puncture were obtained. Rats were subsequently euthanased by decapitation. The tympanic bullae were dissected from the surrounding tissues and opened, and the cochlear portion was separated. Under magnification, the bony wall of the cochlea and the spiral ligament were removed, so that the upper aspect of the organ of Corti was exposed. Cochleae were fixed in a 2.5% solution of glutaraldehyde in 0.1 mol/L sodium cacodylate buffer, and

afterwards they were dehydrated in 10%, 30%, 70%, 90%, and 100% concentrations of ethanol and critical point-dried with an Emitec 850 stem, sputter-coated with a BioRad SC-650 and observed under a Phillips XL-30 scanning microscope.

HSP-70 detection procedure

The presence or absence of HSP-70 in serum was determined and no quantification was performed, as this study was intended to provide a rapid method for detection of ear damage in cases of high risk of ototoxicity.

A Western blot immunoassay for detection and identification of antibodies to the 68 kDa antigen associated with SNHL (OTOblot® anti-68kD (HSP-70) Inner Ear Antibodies, IMCO Diagnostics, Buffalo, NY, USA) was performed. Since this kit was originally created for recognition of the human HSP-70 antigen, modifications of the protocol recommended by the manufacturers had to be made. Briefly, antigen-containing strips were blocked for 30 min and then incubated with the rat sera 1:101 diluted in the blocking diluent for 1 h with gentle agitation. After thorough washing, they were incubated with 1/10 000 F(ab')₂ rabbit anti-rat alkaline phosphatase conjugate (Serotec, Raleigh, NC, USA) for 30 min. Then, the strips were washed again and incubated with the precipitable substrate provided in the kit until the desired band intensity was reached. Finally, the strips were washed and air-dried overnight. All incubation steps were performed at room temperature.

Statistical analysis

Data are expressed as means. The differences in the BAER thresholds between animals with positive and negative Western blot results were analyzed using the 11.0 version of SPSS statistical software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Nonparametric statistics (χ^2 test) were employed for determination of statistical significance of the differences among proportions. A significance level of 0.05 two tails was assumed.

Results

Western blot was positive in a much higher proportion of animals from the 7 days group (14 of 18, 77.8%) than from the 90 days group (8 of 14, 44.4%) ($p=0.040$). Only one (5.5%) animal from the control group showed a positive result.

Table I shows mean auditory thresholds in animals from the cisplatin and the control groups. All the animals from the cisplatin group showed decreased

566 R. Ramirez-Camacho *et al.*

Table I. Mean hearing levels (in decibels) in study and control group animals before cisplatin injection and at sacrifice.

Group	Mean thresholds at the beginning of the study (dB)	Mean thresholds at the end of the study (sacrifice) (dB)
Controls ($n=18$)	15.3	15
7 days survival ($n=18$)	14.2	32.1
90 days survival ($n=18$)	19.7	41.6

auditory thresholds after the injection of cisplatin, both in the short- and in the long-term subgroups.

Scanning microscopy of the inner ear of rats showed the loss of a number of outer hair cells at both 7 days and 90 days (Figures 1 and 2). Likewise, degenerative changes in the hair cells surface were observed (Figure 3).

Discussion

Cisplatin is a widely used antineoplastic agent in the treatment of solid tumors, but side effects like ototoxicity and nephrotoxicity are dose-limiting factors [5]. Cisplatin ototoxic action consists of large destruction of outer hair cells in the basal turn of the cochlea, with less severe damage in the upper turns. With increasing doses or prolonged administration, damage eventually progresses to the inner hair cells; supporting cells appear to be well preserved [6]. Observations in human histological preparations from temporal bone collections are in agreement with the above-described findings, although inner hair cells were damaged in small areas within the first 2–8 mm of the cochlea [7]. A recent study aimed at detecting intracellular cisplatin in an animal model found this drug in the outer hair cells, the marginal cells and the spiral ligament fibrocytes, and less markedly in the supporting cells [8].

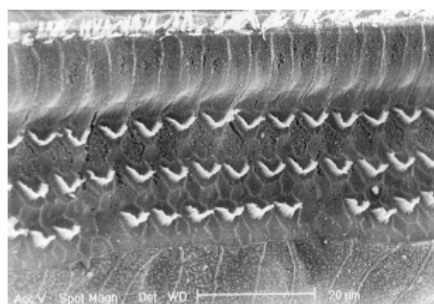


Figure 1. Scanning electron micrograph of cochlear second turn in a 7 days survival animal. Absence of two outer hair cells of the external row can be observed.

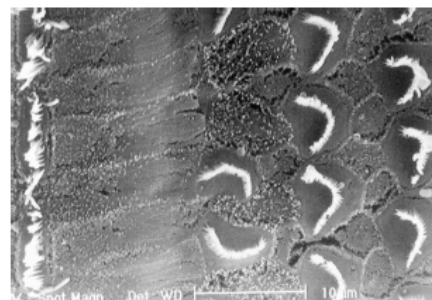


Figure 2. Scanning electron micrograph of cochlea showing a loss of outer hair cells of the internal row in a 90 days survival animal. Note the presence of abnormal positioning of cilia in some inner hair cells.

Ototoxicity is a common side effect in cisplatin-based chemotherapy but does not develop in all patients. Therefore, a serological marker of ototoxicity would allow detection of sensitive patients so that treatment could be stopped or modified to prevent further damage.

Heat shock proteins are a group of intracellular proteins involved in protein synthesis and maturation in normal cells. They are induced by exposure to a high number of stressors and have been implicated in cellular protection from sublethal stress [9]. Antibodies to HSP-70 have been identified in patients with diseases of different origin (i.e. cardiovascular and autoimmune diseases, bacterial and viral infections, multiple sclerosis, hyperthermal stress). HSP-70 has been suggested as a serological marker of inner ear injury. In 1990, Harris and Sharp [10] first described the existence of an elevated serum anti-68 kDa protein in Western blot against bovine inner ear extracts, that may represent HSP-70 [11]. HSP-70 has been proposed as the

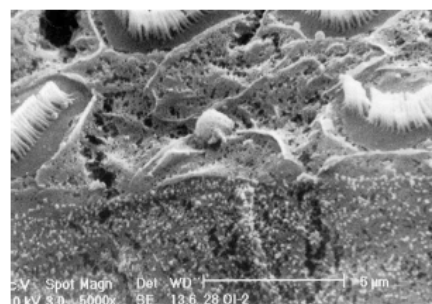


Figure 3. Scanning electron micrograph of cochlea showing coalescence of cilia of outer hair cells (external row) in a 7 days survival animal.

cochlear antigen underlying an autoimmune etiology in certain cases of rapidly progressive, sudden and fluctuating hearing loss, and in Ménière's disease. However, heat shock proteins have been found in non-immunological diseases of inner ear such as cisplatin toxicity. Thus, the expression of HSP-72 has been observed in cochlea of rats following cisplatin injection [4].

Application of the Western blot immunoassay after a single dose of cisplatin in our animals showed that detection of HSP-70 decreased significantly in the long-term survival animals in comparison to those in the short survival group, suggesting that HSP-70 could be an early serologic marker for organ injury.

BAER performed in the study animals after cisplatin administration evidenced the damage of hearing function, although no correlation could be found between thresholds shift and positive or negative results in Western blot. This could be due to the fact that cisplatin may not induce hearing loss in all animals at the dosages used in this study, or because HSP-70 increase could correspond to damage of other organs. HSP-70 has been detected when patients' sera are immunoblotted against protein extracts from other organs such as brain, liver, kidney, and muscle [12], showing its lack of specificity. Moreover, HSP-70 can also be detected in the serum of healthy subjects [13], although in <25%.

The present study suggests that HSP-70 is a nonspecific marker of inner ear damage, which is detected mainly at early stages after injury. Positive results decrease with time after damage occurs. This could explain why routine use of Western blotting for HSP-70 detection in patients with SNHL of different origin yields discrepant results, as seen in different studies in the literature [2,3]. Further studies are needed to evaluate its utility to indicate the administration of an early treatment in some disorders or to stop the administration of drugs that may cause cell damage.

Acknowledgement

This work was supported by FIS grant number 050673.

References

- [1] Bloch DB, San Martín JE, Rauch SD, Moscicki RA, Bloch KJ. Serum antibodies to heat shock protein 70 in sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121:1167-71.
- [2] García Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Arellano B, Vargas JA. Validity of the Western blot immunoassay for heat shock protein 70 in associated and isolated immunorelated inner ear disease. *Laryngoscope* 2002;112:304-9.
- [3] Yeom K, Gray J, Nair TS, Arts HA, Telian SA, Disher MJ, et al. Antibodies to HSP-70 in normal donors and autoimmune hearing loss patients. *Laryngoscope* 2003;113:1770-7.
- [4] Oh SH, Yu WSY, Song B-H, Lim D, Koo J-W, Chang SO, et al. Expression of heat shock protein 72 in rat cochlea with cisplatin-induced acute ototoxicity. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 2000;120:146-50.
- [5] Stadnicki SW, Fleischman RW, Schaeppi U, Merriam P. Cis-dichlorodiammineplatinum (II) (NSC-119875): hearing loss and other toxic effects in rhesus monkeys. *Cancer Chemother Rep* 1975;59:467-80.
- [6] Komune S, Asakuma S, Snow JB. Pathophysiology of the ototoxicity of cis-diaminedichloroplatinum. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1981;89:275-82.
- [7] Hinojosa R, Riggs L, Strauss M, Matz G. Temporal bone histopathology of cisplatin ototoxicity. *Am J Otol* 1995;16:731-40.
- [8] Van Ruyven MWM, de Groot JCMJ, Hendriksen F, Smoorenburg GF. Immunohistochemical detection of platinum DNA in the cochlea of cisplatin-treated guinea pigs. *Hear Res* 2005;203:112-21.
- [9] Burel C, Merger V, Pinto M, Rallu M, Trigon S, Morange M. Mammalian heat shock protein familial. Expression and function. *Experientia* 1992;48:629-34.
- [10] Harris JP, Sharp PA. Inner ear autoantibodies in patients with rapidly progressive sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1990;100:516-24.
- [11] Billing PB, Keithley EM, Harris JP. Evidence linking the 68 kilodalton antigen identified in progressive sensorineural hearing loss patient sera with heat shock protein 70. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:181-8.
- [12] Moscicki RA, San Martín JE, Quintero CH, Rauch SD, Nadol JB Jr, Bloch KJ. Serum antibody to inner ear proteins in patients with progressive hearing loss. Correlation with disease activity and response to corticosteroid treatment. *JAMA* 1994;272:611-16.
- [13] Pockley AG, Shepherd J, Corton JM. Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest* 1998;27:367-77.

